Untersuchungen zur Bestimmung des Umsatzes von markiertem Adenin an Suspensionskulturen

München 1962

Lida-Vera Schneider

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546810_0053

R. NAT.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER
UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. W. Büngeler

Untersuchungen zur Bestimmung des Umsatzes von markiertem Adenin an Suspensionskulturen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Lida-Vera Schneider
Halberstadt/Harz

München 1962

A. Schubert, München 5, Corneliusstraße 21 · Telefon 221777

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. WRBA
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. BÜNGELER
Dekan:	Prof. Dr. A. HERRMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 12. 1962

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG 5

B. MATERIAL UND METHODE 6

1. Herkunft der Zellen 6
2. Methode der Suspensionskultur für L-Zellen 7
3. Versuchsansatz und Auswertung 13
4. Verwendete markierte Substanzen 23
5. Versuchsanordnungen zur Beeinflussung des Zellstoffwechsels 25

C. VERSUCHSERGEBNISSE 28

1. Aufnahme von markiertem Adenin durch L-Zellen 28

a) Zur Frage der Zersetzung von Adenin 28
b) Aufnahme der markierten Base durch L-Zellen 28
c) Bestimmung der günstigsten Adeninkonzentration für die Verwertung durch L-Zellen 31
d) Angebot von inaktivem Adenin an L-Zellen 31

2. Abhängigkeit der Adeninaufnahme vom biologischen Stadium der Zelle 37

a) Unterschiede in der Stoffwechsellage von Fibroblasten zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Vermehrung in vitro 37
b) Adeninangebot an hitzedenaturierte Zellen 37
c) Adeninaufnahme durch Zellen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Nährmediums 40
d) Adeninaufnahme durch Zellen in Nährlösungen mit Zusatz von Blutserum verschiedener Spendertierarten 40
e) Adeninaufnahme durch Zellen nach längerer Kultur in Medium unter Zusatz von Rattenserum 40

Seite

3. Wirkung chemischer und physikalischer Faktoren auf die Adeninaufnahme durch Zellen in vitro 45

a) Wirkung von Monojodessigsäure auf L-Zellen und Zellen des Mäuseascitestumors in vitro 45
b) Wirkung von Butazolidin 50
c) Wirkung von Colchicin 50
d) Wirkung von Röntgenstrahlen 50

4. Zur Aufnahme von Guanin durch L-Zellen 56

5. Zur Frage der Eignung verschiedener Methoden 56

a) sog. schneller Roller-Apparat 56
b) Polyamidgitter im schnellen Roller-Apparat 56
c) sog. langsamer Roller-Apparat 59
d) stehende Vierkantflaschen-Kultur 62
e) Carrelflaschen-Kultur 62
f) Kurvenmässige Darstellung der Aufnahme an ^{14}C-Adenin für die verwendeten Methoden 62

D. DISKUSSION 65

E. ZUSAMMENFASSUNG 74

LITERATURVERZEICHNIS 76

A. EINLEITUNG

Die Objektivierung von Stoffwechselvorgängen und die Bestimmung der Integrität der lebenden Zelle stösst auf Schwierigkeiten. Auf Beurteilung der Zellmorphologie fussende Methoden -wie Zählung der Mitosen in der fixierten und gefärbten Gewebekultur oder Messung der ausgewachsenen Gewebsoberfläche- schädigen das Substrat irreversibel oder erfassen nur eine Teilfunktion. Zudem liegt bei einer Vitalitätsminderung weit vor der morphologisch fassbaren Alteration die erste Störung in der Biochemie der Zelle, sie kann nur durch Erprobung des Zellchemismus veranschaulicht werden. So ist durch die Bestätigung von Stoffumsatz und erhaltener stofflicher Syntheseleistung die Integrität nachzuweisen, da die Synthese zelleigener Stoffe aus Bausteinen oder Vorläufern an die regelrechte Funktion zahlreicher ineinandergreifender Fermentsysteme gebunden ist (1).

Am wachsenden Gewebe gelingt die Untersuchung des Stoffumsatzes durch Bestimmung von Einbau und Umsatz geeigneter radioaktiv markierter Verbindungen, wobei eine strenge Spezifität der Aufnahme (2, 3), Abhängigkeit von der Stoffwechsellage der Zelle und Beeinflussbarkeit durch Hemmwirkungen die Methode besonders brauchbar erscheinen lassen. Voraussetzung ist, dass die markierten Substanzen keine Störung im Zellstoffwechsel hervorrufen.

Als Purinbase wird ^{14}C-markiertes Adenin in die zelleigenen Nucleinsäuren eingebaut und zwar hauptsächlich in die im Kern enthaltene DNS. Dieser Einbau gibt offenbar Aufschluss über die Intaktheit der Systeme, die an Synthese und Polymerisation der Nucleotide beteiligt sind und liefert gleichzeitig eine Aussage über die Energielage der Zelle (4). Daneben ist Adenin ein Baustein gewisser Coenzyme und der energiereichen Phosphate. Brown et al. (5) fanden bei der Verfütterung von markiertem Adenin 2,6 % der Substanz im Muskel-ATP, während 13,7 % für die Nucleinsäuresynthese verwendet wurden.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, durch Anwendung dieser Substanz Methoden zur Bestimmung des Stoffumsatzes in vitro suspendierter Zellen zu entwickeln. Sie werden durch physikalische und chemische Reize in ihrem Stoffwechsel verändert und ihre Aufnahmeleistung für die markierte Verbindung unter diesen Bedingungen untersucht.

B. MATERIAL UND METHODE

1. HERKUNFT DER ZELLEN: a) Fibroblastenstamm L
b) Ehrlichscher Mäuse-ascitestumor (MAT)

a) 1940 wurde von Earle (6) aus dem Unterhautfettgewebe von Mäusen des C3H-Stammes ein erster Stamm von Fibroblasten in vitro gewonnen. Nach 291 Tagen wurde den verschiedenen Zellkulturen über verschiedene Zeiträume Methylcholanthren zugesetzt, der Stamm L erhielt diesen Zusatz 111 Tage. Hierauf wurden einige Kulturen dem C3H-Stamm reinjiziert, worauf in 46 % der Fälle maligne Tumoren wuchsen (7, 8). 1948 gelang es Sanford, Earle und Likely (9), aus einer einzigen Zelle dieses L-Stammes den heute verwendeten, reinen Fibroblastenstamm zu züchten.

Die Frage, ob diese Zellen sich heute maligne verhalten, ist sehr schwierig zu klären, es gibt keine sichere Methode hierfür. Mehrere Autoren fanden spontane Aus- und Rückbildung von Malignität bei Zellen in vitro. Sanford et al. (10) berichten, "dass Fibroblasten des C3H-Mäuse-Stammes, die in heterologem Kulturmedium ohne jegliches bekanntes carcinogenes Agens gezüchtet werden, die Fähigkeit erwerben, bei der Injektion Sarkome zu produzieren".

Wir injizierten in 2 Versuchen L-Zellen Mäusen des Wiga- Albino-Stammes, der durch Bruder-Schwester-Kreuzung vermehrt wird; es erhielten am 24.II.61 13 Mäuse die Zellen aus 15 Vierkantflaschen, suspendiert in 6 ml Hankslösung, s.c. in die Flanke injiziert. Von diesen Tieren starb am 7., 24.III. und 6.IV. je eines spontan, am 27.IV. wurden die restlichen 10 als gesund abgesetzt.

Am 27.III.61 wurde der Inhalt aus 30 Vierkantflaschen L-Zellen in 5 ccm Hankslösung 10 Mäusen s.c. injiziert, von denen am 14.III. und 6.IV. je eine spontan starb, am 22.VIII. wurden die restlichen Tiere gesund abgesetzt.

Die übliche Versuchsdauer für die Prüfung der Ausbildung eines Tumors nach Injektion beträgt 100 Tage.

b) In einer Reihe von Versuchen verwendeten wir in vitro suspendierte Zellen des Ehrlichschen Mäuseascitestumors. Bei unserem Stamm dieser Geschwulst handelt es sich um den sogenannten "alten Stamm", der am Heidelberger Institut für experimentelle Krebsforschung seit über 10 Jahren gehalten wird.

Die Zellen wachsen bei entsprechend intraperitoneal beimpften Tieren

freischwimmend in der Bauchhöhle und führen nach etwa 14 Tagen zum Tode. Wir verwendeten grundsätzlich nur Ascitestumoren, die sich zwischen dem 7. und 10. Tag nach der Überimpfung befanden. Im mm^3 finden sich etwa 100 000 - 200 000 Zellen.

2. METHODE DER SUSPENSIONSKULTUR FÜR L-ZELLEN:

Die Zellen (Abb. 1) werden in Vierkantflaschen von ca. 45 cm^2 Bodenfläche (Abb. 2) in 10 ccm Medium gezüchtet, bestehend aus:

10 % Embryonalextrakt des 10 Tage bebrüteten Hühnchens (=EE)
20 % Kälberserum (=KS). Es ist wichtig, dass das frisch vom Schlachthof geholte, durch Seitz-Filtration sterilisierte Serum von möglichst jungen Kälbern stammt, da nach Carrel und Ebeling (11) die Vermehrungsrate von Fibroblasten und ihre Lebensdauer in vitro im umgekehrten Verhältnis zu dem Alter des Tieres steht, von dem das Serum entnommen wurde.

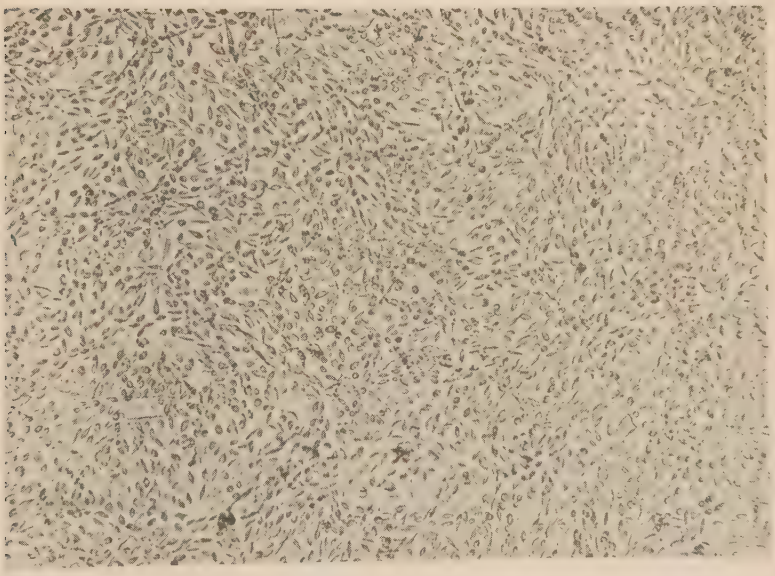


Abb. 1: Kultur von Mäusefibroblasten (L-Zellen) nach 6tägigem Wachstum. Vergr. 72x.

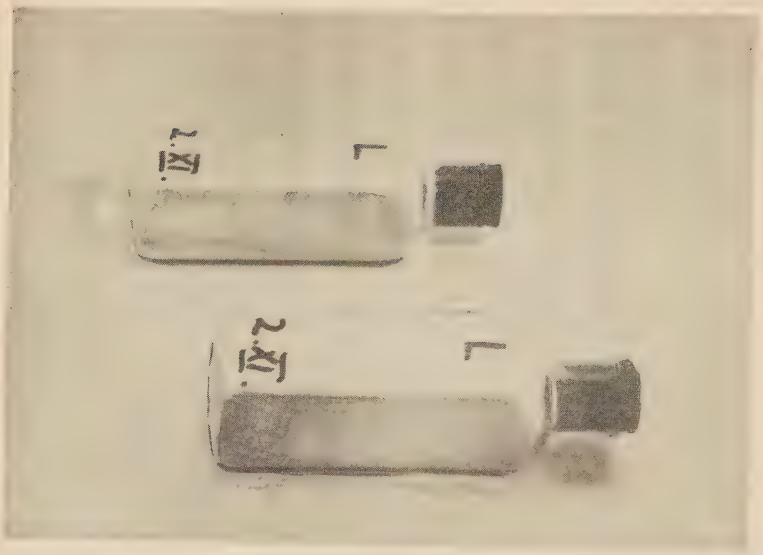


Abb. 2: Vierkantflasche (Bodenfläche 45 cm^2) zur Züchtung von L-Zellen.

70 % Hankslösung (isotonische Salzlösung mit den Bestandteilen: NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgSO_4$, $MgCl_2$, Na_2HPO_4, KH_2PO_4, Dextrose, H_2O, $NaHCO_3$, Phenolrot). Die durch das Phenolrot bestimmte Farbe des Mediums dient als Indikator für die Ernährungslage der Zelle, mit Anhäufung saurer Stoffwechselendprodukte wird die Lösung zunehmend gelber.

Pro 10 ccm Medium werden ausserdem 6000 E Penicillin -Penicillin G Hoechst, krist. Natriumsalz- zugesetzt.

Nach 5 - 7 Tagen werden die Zellen jeweils aus einer Flasche in zwei andere umgesetzt, nachdem sie mit einer 0,06 %igen Trypsinlösung von der Glaswand abgelöst wurden. Das Wirkungsoptimum der Fermentlösung liegt bei $p_H = 8$ (da nur die Anionen proteolytisch wirksam sind, die Wirksamkeit genau der Anionenmenge proportional ist und die Säuredissoziationskonstante 5×10^{-7} beträgt. Abwärts von 10^{-8} vermindert sich die Wirksamkeit wieder (12).

Die Zellen werden dann 1 Min. bei 750 Upm zentrifugiert, mit neuem Medium versehen und die Kulturflaschen in Dunkelheit bei der für das Wachstum optimalen Temperatur von 37,4°C im Brutschrank aufbewahrt. (Gassul

(13) berichtet, dass Explantate unter Ausschluss des Tageslichtes eine um 1/4 bis 1/3 längere Lebensdauer haben als die im Tageslicht gehaltenen Kontrollkulturen.)

Nach 4 - 5 Stunden sind die Fibroblasten bereits angewachsen und können mikroskopisch durch das Glas hindurch in situ untersucht werden. Dabei ergibt sich für die einzelnen Tage nach dem Umsetzen eine charakteristische Morphologie: zunächst sind die Zellen noch abgekugelt, da Trypsinieren und Zentrifugieren erhebliche Reize bzw. Schäden darstellen (14). Allmählich bildet sich wieder die charakteristische Spindelform aus, Mitosen nehmen zu, bis sich nach 5 - 6 Tagen Riesenzellen in zunehmendem Masse als Ausdruck des Nährstoffmangels zeigen (15). Als allgemeines Charakteristikum der Fibroblastenkolonie (16) findet man schon bald nach dem Umsetzen, dass die Zellen nie in isolierten Einheiten wachsen, sondern ein dichtes Gewebe formen. Fischer (17) fand, dass im Kulturmedium isolierte Zellen nicht proliferieren, damit Vermehrung eintritt, müssen die Fibroblasten in engem Kontakt stehen (Abb. 3 - 9. Die Präparate wurden gewonnen, indem in die Kulturflaschen eingelegte Deckgläschen zu den gewünschten Zeitpunkten entnommen, in Methanol fixiert und mit Haemalaun gefärbt wurden).

Abb. 3 - 9: Fixierte und Haemalaun- gefärbte Präparate von L-Zellen nach 1 - 7tägigem Wachstum in der Kultur. Vergr. 800x

Abb. 3: 1 Tag nach dem Umsetzen sind noch wenig Zellen im Präparat zu sehen, die charakteristische Spindelform hat sich jedoch bereits zum grossen Teil ausgebildet.

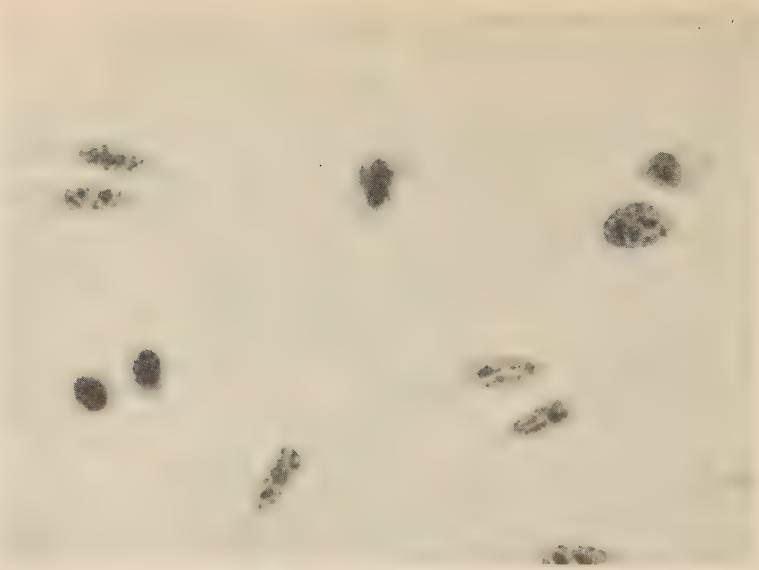


Abb. 4: Am 2. Tag des Wachstums nach Teilung der Kultur nimmt die Zellzahl allmählich zu, Mitosen werden sichtbar.

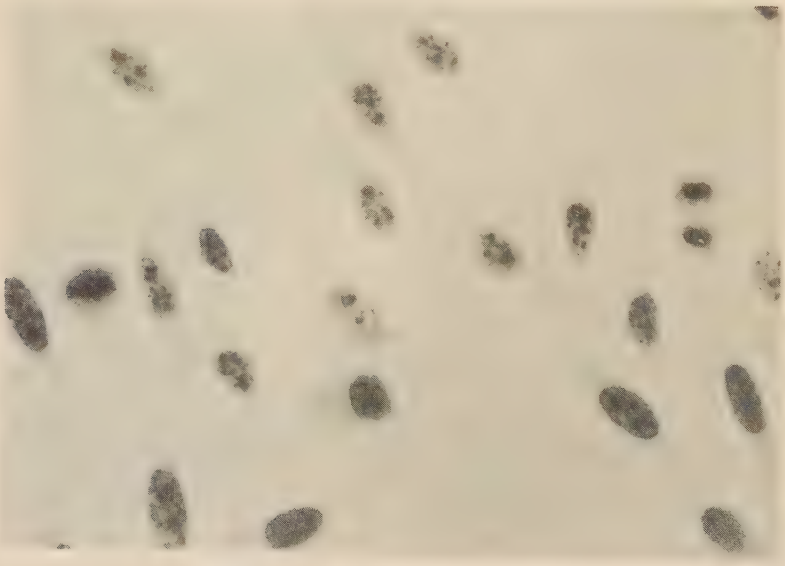


Abb. 5: Mitosen und Zellzahl nehmen mit weiterem Abstand vom Zeitpunkt des Umsetzens zu.

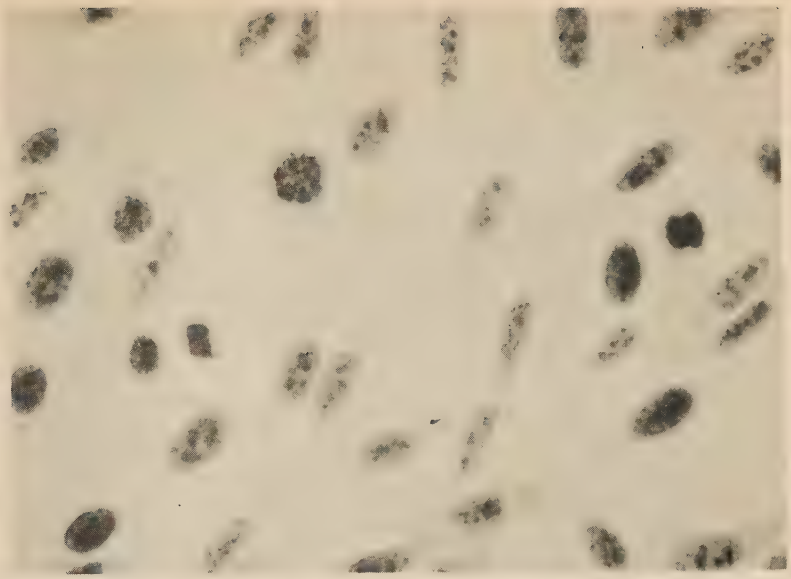


Abb. 6: Mitosen und Zellzahl nehmen mit weiterem Abstand vom Zeitpunkt des Umsetzens zu.

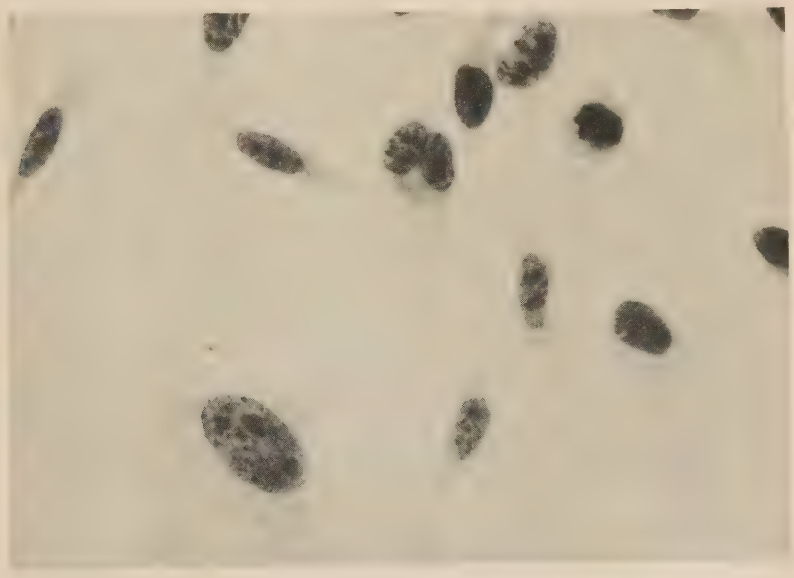


Abb. 7: Am 5. Tag des Wachstums in vitro ohne Erneuerung der Nährflüssigkeit zeigt sich als Ausdruck zunehmenden Nährstoffmangels die Ausbildung mehrkerniger Riesenzellen und wabiger Protoplasmastrukturen. Einzelne Mitosen sind noch vorhanden.

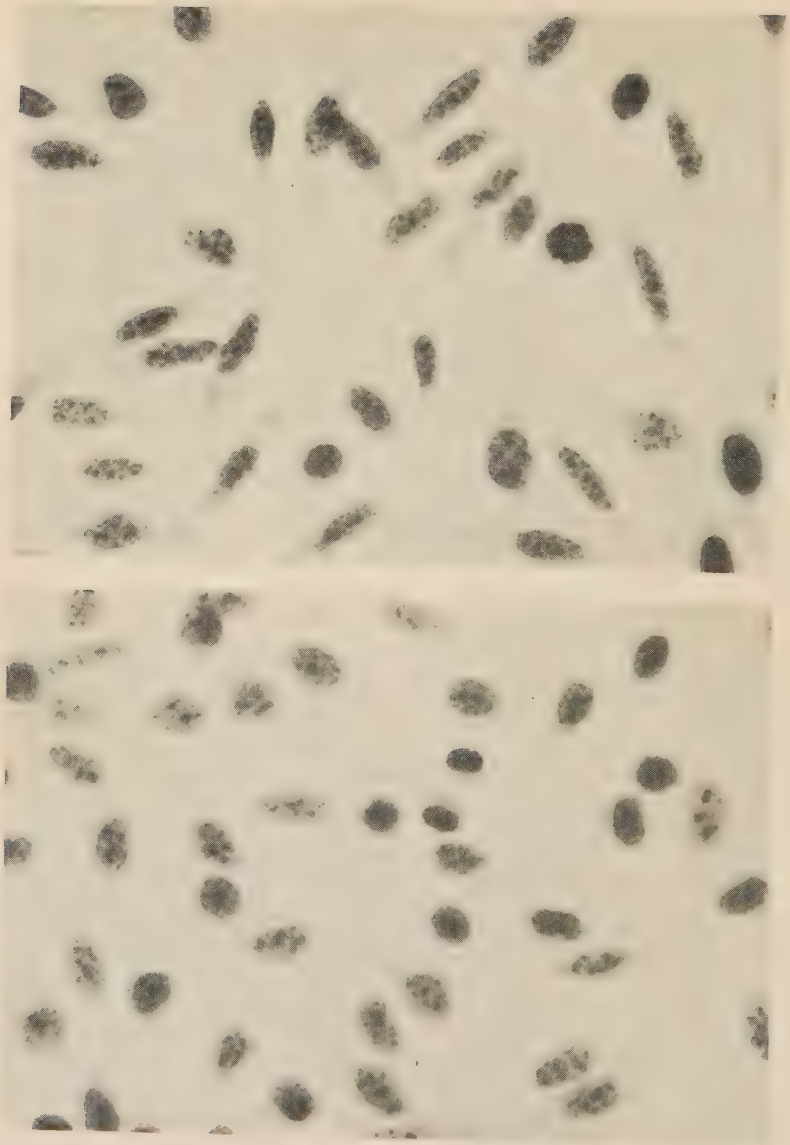


Abb. 8 + 9: Die Zellzahl hat weiter zugenommen, am 7. Tag nach Umsetzen (Abb. 9) sind die meisten Fibroblasten bereits abgekugelt, die Zellen müssen umgesetzt oder mit frischer Nährlösung versehen werden.

3. VERSUCHSANSATZ UND AUSWERTUNG:

Es werden für die Experimente folgende Methoden verwendet:

a) der sogenannte "schnelle Roller-Apparat"
b) Polyamidgitter im schnellen Roller-Apparat
c) der sogenannte "langsame Roller-Apparat"
d) stehende Vierkant- und Carellflasche

a + c) Die Zellen wurden bei den anfänglichen Versuchen aus den Kulturflaschen mit 0,06 %iger Trypsinlösung herausgelöst, später entweder mit dem alten Medium von der Glaswand abgespült oder mit Hilfe des von Evans et al. (18) angegebenen Platin-Iridium-Spatel abgekratzt. Wir nahmen dabei an, dass die mechanische Behandlung die Zellen weniger schädige als die Fermentwirkung, was sich, soweit beurteilbar, in der Zellmorphologie einige Stunden nach dem Umsetzen als richtig erwies.

Nach der Loslösung werden die Fibroblasten mit dem verbrauchten Medium 1 Min. bei 750 Upm zentrifugiert, das Medium abpipettiert und die Zellen in neuer Nährflüssigkeit aufgenommen. Hierzu wird das synthetische Tissue Culture Medium (TCM) Nr. 199 (19) mit einem Zusatz von 20 % Kälberserum verwendet. Die von den Behringwerken versandte, gelbe TCM-Lösung, die hauptsächlich aus Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen und Vitaminen besteht, wird mit ca. 2,5 ccm 5,6 %iger $NaHCO_3$-Lösung pro 100 ccm TCM auf die gewünschte rote Farbe gebracht, mit 1 ccm Penicillin pro 100 ccm dieser Lösung versetzt und mit dem Kälberserum durch Seitz-Filtration sterilisiert.

Nachdem die Zellen die neue Nährflüssigkeit erhalten haben, werden je 3 bzw. 5 ccm dieser Suspension auf die gewünschte Anzahl von Röhrchen (ca. 16 cm lange, 1,5 cm im Durchmesser betragende Glasröhrchen) verteilt und je 0,3 /uC/ml 8-^{14}C-Adenin zugesetzt. Die Röhrchen werden nun in den langsamen bzw. schnellen Roller-Apparat gebracht. Es handelt sich dabei um einen trommelförmigen Apparat, der in einem Brutschrank aufgestellt ist. In der Trommel befinden sich etwa 60 Bohrungen, in welche die Röhrchen eingesteckt werden. Die Trommel rotiert um den Mittelpunkt, so dass die leicht nach dem hinteren Ende geneigten Röhrchen um ihre Querachse rotieren.

Im Falle des sog. langsamen Roller-Apparates dreht sich das Röhrchen etwa 8,5x/Stunde um seine Querachse, im Falle des schnellen Roller-Apparates 4600 mal pro Stunde, so dass die an der Glaswand haftenden Zellen abwechselnd mit Nährmedium bespült werden und mit Luft in Berührung kommen.

Die Auswertung unterscheidet sich bei den beiden Methoden:

α) Aus dem langsamen Roller-Apparat wird nach 3, 6, 9, 24, 48 Stunden je ein Röhrchen entnommen, das Medium wird entfernt. Je 3 ccm Trypsinlösung werden zugegeben und das Röhrchen wieder 1/4 Stunde in den Roller-Apparat gebracht, um die für die Fermentwirkung optimale Temperatur zu erreichen. Die abgelösten Zellen werden dann mit der Trypsinlösung und ca. 3 ccm Hanks lösung (da die Zellen in Trypsinlösung allein schlecht sedimentieren) 2 Min. bei 3500 Upm zentrifugiert, in 2 ccm Hanks lösung gewaschen und nochmals zentrifugiert.

In einem Vorversuch hatte sich gezeigt, dass Adeninspuren, die den Zellen äusserlich anhaften, die Ergebnisse verwischen können, während durch Waschen diese Fehlerquelle ausgeschaltet wird.

Die weitere Auswertung erfolgt wie bei Verwendung des schnellen Roller-Apparates.

ß) In die Röhrchen, welche für den schnellen Roller-Apparat vorgesehen sind, werden bei Versuchsbeginn jeweils 5 - 6 ccm Zellsuspension mit ca. 0,3 /uC/ml Adenin (die genaue Angabe findet sich bei den Versuchsergebnissen) gegeben und nach 3, 6, 9, 24, 48 Stunden (die Zeiten werden bei einzelnen Versuchen variiert) je 1 ccm Flüssigkeit entnommen, zentrifugiert und gewaschen. Sodann wird wie bei Verwendung des schnellen Roller-Apparates nach dem zweiten Zentrifugieren der Überstand verworfen und das Zellsediment in 1 ccm Aqua dest. aufgenommen. Je 2 Tropfen dieser Suspension werden auf ein in Alkohol-Aceton gereinigtes und entfettetes, gewogenes Stahlplättchen aufgetragen und mit einer Glasnadel in einem mit Hilfe eines Diamanten aufgeritzten, zentralen Ring von konstanter Oberfläche ausgestrichen. Das Präparat wird 2 Stunden im Brutschrank bei 60^{o} C getrocknet, danach werden die Plättchen gewogen und im fensterlosen Zählrohr in Methanatmosphäre gemessen. Die Impulszahl wird für die Auswertung auf 1 mg Substanzgewicht bezogen.

Um die Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Entnahme auch morphologisch beurteilen zu können, werden bei dem 3-, 24- und 48-Stunden-Wert aller Versuche im schnellen Roller-Apparat je 2 Tropfen der Zellsuspension auf einem Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet, fixiert und Haemalaun-gefärbt.

Es wird untersucht, ob die Passage im schnellen Roller-Apparat die Zellen schädigt:

α) Die Fibroblasten aus 6 Flaschen werden in Medium auf Embryonalex-

trakt-Basis (= EE, KS, Hanks) auf 10 Rollerröhrchen verteilt, wovon je 5 im schnellen und im langsamen Roller-Apparat (letztere als Kontrolle) rotieren. Jeden Tag werden die Zellen aus je einem Röhrchen aus beiden Apparaten wieder in Flaschen zurückgebracht und das Wachstum nach Fixierung und Färbung eingelegter Deckgläschen beurteilt.

ß) Es wird die Änderung der Zellzahl nach 24- bzw. 48-Stunden-Passage im schnellen Roller-Apparat untersucht: die Zellen aus einer Vierkantflasche werden in 2 Röhrchen umgesetzt, in den Roller-Apparat gebracht und nach 1, 24 und 48 Stunden Laufzeit Proben zur Zellzählung entnommen (Zählkammer nach Thoma).

Die Versuche mit Zellen des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Carcinom (MAT) im schnellen Roller-Apparat werden folgendermassen angesetzt:

7 ccm MAT werden am 7. bis 8. Tag nach der Überimpfung frisch durch Punktion ascitestragender Mäuse gewonnen, in 25 ccm Hankslösung gewaschen, 1 Min. bei 750 Upm zentrifugiert und in neuem Medium aufgenommen: 10 % EE, 20 % Pferdeserum, 70 % Hankslösung, 6000 E Penicillin.

Das Pferdeserum ist im Handel erhältlich (Behringwerke) und nach Zentrifugieren (10 Min. bei 3500 Upm) gebrauchsfertig.

Weiterer Versuchsansatz und Auswertung erfolgen wie bei den Versuchen an Fibroblasten.

b) Wir hatten den Eindruck, dass L-Zellen physiologischerweise in der für Fibroblasten charakteristischen Spindelform auf einer Unterlage optimal wachsen. Um die Vorteile der freien Suspension mit der Möglichkeit auf Substrat wachsender Zellen zu verbinden, versuchten wir, frei flottierende Perlonnetze in der Nährlösung schwimmend zu halten. Zur Verwendung kam Perlongitter Monodur (Vereinigte Seidenwebereien Krefeld).

Folgende Vorversuche werden unternommen:

α) Erprobung der optimalen Maschenweite: es werden 6 Gitter und 3 Fasern verschiedener Monodur-Qualitäten ausprobiert: Gitter Nr. 140 (Fadendurchmesser: 80 /u, Maschenweite: 140 /u) bis Nr. 425 (Fadendurchmesser: 200 /u, Maschenweite: 425 /u) und einzelne Fasern aus den Gittern 800 (Fadendurchmesser: 275 /u) bis 1800 (Fadendurchmesser: 530 /u). Nach Methanol-Fixation und Haemalaunfärbung der mit Zellen besiedelten Netze ergibt sich als für das Zellwachstum optimale Qualität Nr. 140, die für alle folgenden Versuche verwendet wird (Abb. 10 + 11).

ß) Um das (wegen strenger Beachtung der Sterilität) technisch schwieri-

ge Wiegen der Gitter zu umgehen, werden Gewichtskontrollen von 8 Gittern vorgenommen:

unter dem Stereo-Mikroskop werden quadratische Stücke von 11 x 11 Maschenweiten (= ca. 2,5 mm) geschnitten und gewogen. Es ergibt sich hierbei, dass der Unterschied der Gewichte der einzelnen Gitter weniger als 0,05 mg beträgt. Fehler, die kleiner als 0,05 mg sind, sind mit der Mettlerwaage nicht mehr feststellbar und können daher vernachlässigt werden.

γ) Es wird eine eventuelle Aktivitätsaufnahme durch das Gitter selbst untersucht:

in 4 Rollerröhrchen werden je 3 ccm Medium auf TCM-Basis gegeben, dazu je ein Polyamidgitter, in 2 der Röhrchen der Inhalt einer Kulturflasche von L-Zellen. Nach Zusatz von 0,3 /uC/ml ^{14}C-Adenin rotieren die Röhrchen 3 Stunden im schnellen Roller-Apparat, die Gitter werden dann entnommen, je 2 mal in Hankslösung gewaschen, getrocknet und im Methanzähler gemessen. Dabei ergeben sich für die zellhaltigen Gitter Impulse von 2000 - 5000 pro Minute, für die zellfreien der praktisch zu vernachlässigende Wert von 20 - 30 Impulsen/Minute.

Abb. 10 + 11: Fixierte und Haemalaun-gefärbte L-Zellen nach 24-stündigem Wachstum auf dem Perlongitter "Monodur" im schnellen Roller-Apparat. Vergr. 60x

Abb. 10: Gitter mit der Maschenweite 140/u: die Zellen füllen die Zwischenräume des Netzes vollständig aus.

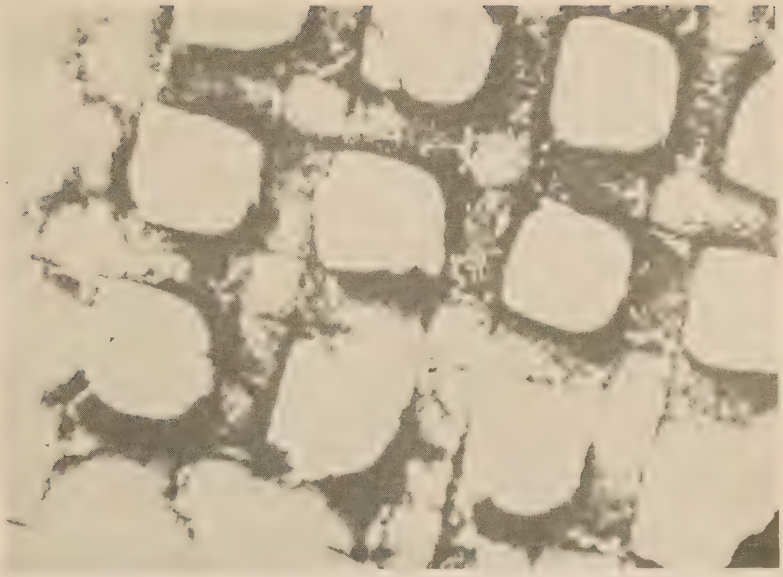


Abb. 11: Die kritische Maschenweite ist bereits überschritten, bei einer Weite von 335 /u wachsen die Fibroblasten nur entlang der Perlonfasern, sie sind nicht imstande, die Zwischenräume auszufüllen.

δ) Da die Gitter, wie die L-Zellen in den Röhrchen des schnellen Roller-Apparates überhaupt, am Ende der waagrecht rotierenden Flüssigkeitsschicht leicht festhaften, wird ein Vorversuch mit silikonisierten Röhrchen unternommen:

die mit Wacker-Silikonöl AK 350 und Tetrachlorkohlenstoff behandelten Glasgegenstände (der Überzug wird 6 Stunden bei 200° C eingebrannt) weisen eine völlig glatte Oberfläche auf und wir nahmen an, dass diese das Haften von Zellen und Gittern verhindern werde. Dies erweist sich im Versuch jedoch nicht als richtig, die silikonisierten Röhrchen verhalten sich in Bezug auf Haftfähigkeit der Zellen genauso wie die nicht behandelten Gläser.

Methode der Auswertung der Adeninaufnahme durch Zellkulturen auf Polyamidgittern:

Aus einer Kulturflasche von L-Zellen werden die Zellen mit dem alten Medium von der Wand abgespült, 1 Min. bei 750 Upm zentrifugiert, nach Ent-

fernung der Flüssigkeit das Sediment in 5 ccm TCM-Medium aufgenommen und gleichzeitig mit 12 Polyamidnetzen (Nr. 140, je 10 x 11 Maschenweiten, durch 3-stündiges Erhitzen auf 160° sterilisiert) in ein Rollerröhrchen gebracht. Nach Zusatz von 0,3 /uC/ml ^{14}C-Adenin wird das Röhrchen in den schnellen Roller-Apparat eingelegt.

Auswertung: nach 4, 7, 24, 30, 50, 53 Stunden werden je 2 Gitter entnommen, in Petrischalen getrennt 2 x 10 Min. in Hankslösung gewässert, auf vorher in Alkohol-Aceton gereinigte Stahlplättchen gebracht, getrocknet und im Methan-Durchflusszähler gemessen.

d) Die Zellen werden in Vierkant- und Carrelflaschen gezüchtet:

α) Für die Versuche in Vierkantflaschen wird die übliche Nährflüssigkeit aus Embryonalextrakt, Kälberserum und Hankslösung verwendet. Zu der gewünschten Anzahl von Kulturflaschen, die jeweils alle am gleichen Tag umgesetzt worden waren, wird bei Versuchsbeginn je 0,2 /uC/ml bis 0,3 /uC/ml ^{14}C-Adenin gegeben (genaue Angabe bei den Versuchsergebnissen), zu verschiedenen Zeitpunkten werden Flaschen aus dem Brutschrank entnommen und ausgewertet:

das alte Medium wird abpipettiert, nach Zusatz von 4 ccm Trypsinlösung werden die Zellen 1/4 Stunde im Brutschrank der Fermentwirkung ausgesetzt und danach 2 Min. bei 3500 Upm zentrifugiert. Die weitere Auswertung erfolgt wie bei den Experimenten im schnellen Roller-Apparat.

Als erste Fragestellung untersuchten wir an Zellen aus Vierkantflaschen die Wirkung des Zusatzes homologer und heterologer Blutseren auf den Stoffwechsel:

L-Zellen werden 2 Monate lang über 12 Passagen in 10 % EE, 20 % Rattenserum (= RS), 70 % Hankslösung und 6000 E Penicillin gezüchtet. Mit 3 in Kälberserum gezüchteter Flaschen L-Zellen (= KS-Zellen) werden 3 getrennte Stämme begonnen. Die Zellen jeder Flasche werden in je eine in KS und in RS gezüchtete Tochterkultur geteilt. In den folgenden Passagen wird jede RS-Kulturflasche wieder in eine RS- und eine KS-Flasche geteilt, damit für etwa auftretende Veränderungen jeweils eine KS-Kontrollflasche vorhanden ist. Alle Kulturen werden nach 4 - 5 tägigem Wachstum umgesetzt, eingelegte Deckgläschen nach 2 und 4 Tagen entnommen, fixiert und gefärbt. Das Rattenserum wird alle 8 Tage durch Herzpunktion von 5 - 6 Ratten gewonnen.

Bei der 3. Passage fällt auf, dass die in Rattenserum gezüchteten Zellen in viel dichteren Lagen an der Glaswand wachsen als die Kontrollkulturen und nicht wie diese gleichmässig, sondern in unregelmässiger Anordnung. Auch

lassen sich die RS-Zellen beim Zentrifugieren schlechter sedimentieren als die in Kälberserum gezüchteten.

In der 6. Passage zeigt sich bei mikroskopischer Betrachtung der mit Rattenserum kultivierten Zellen in situ eine Vakuolisierung, ebenso fällt seit 2 Passagen eine Knötchenbildung der in RS gezüchteten Zellen auf (Abb. 12 und 13), während die Zellen in Kälberserum-Medium wie üblich wachsen. Auffallend ist die Tatsache, dass die Knötchen in beiden, seit vielen Passagen völlig getrennt gehaltenen RS-Stämmen auftraten, ebenso bei den in Kälberserum kultivierten Zellen, welche in der vorhergehenden Passage Rattenserum erhalten hatten. Die Ausbildung der Knötchen war also offenbar durch den Zusatz von Rattenserum ausgelöst (Abb. 14).

Nach der 12. Passage wird mit 12 Kulturflaschen des einen Stammes in Rattenserum-Medium gezüchteter Fibroblasten ein Versuch zur Adeninaufnahme im Vergleich zu L-Zellen unternommen, die in Kälberserum-Medium in der üblichen Weise gezüchtet waren.

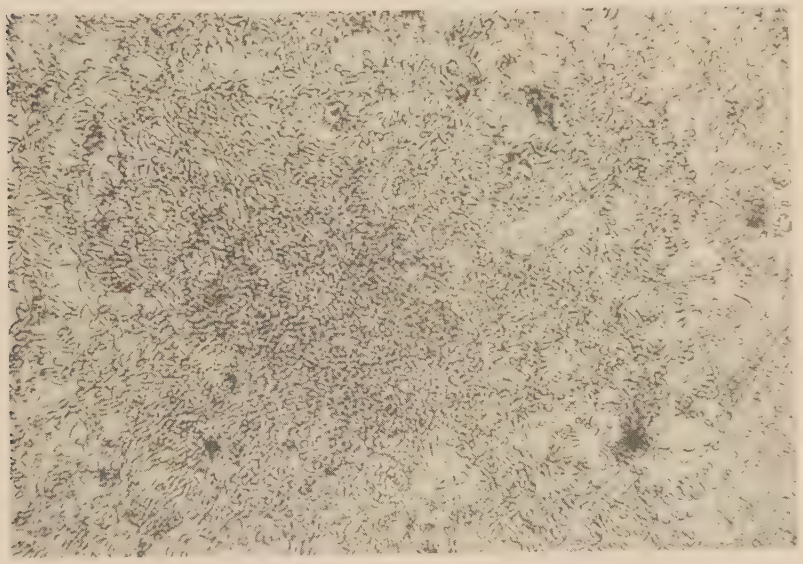


Abb. 12

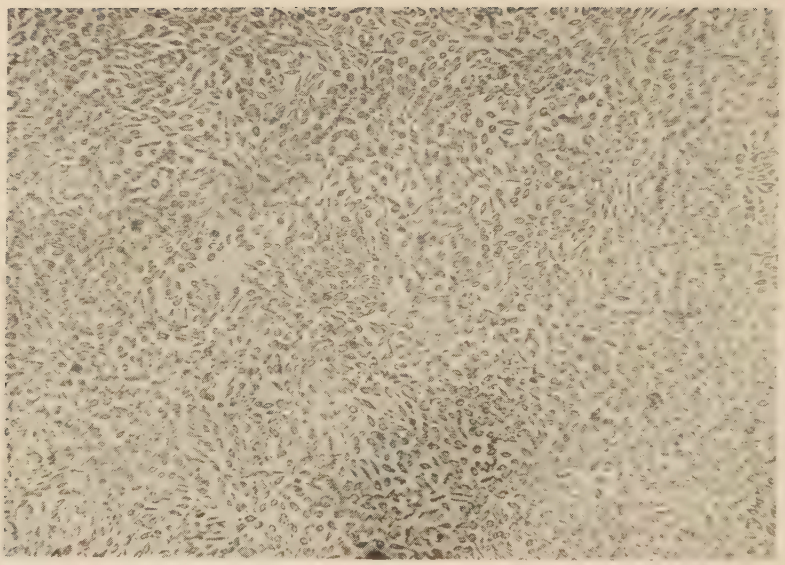


Abb. 13

Abb. 12 + 13: L-Zellen nach Züchtung über mehrere Passagen in Medium mit einem Zusatz von Rattenserum (Abb. 12). Es fällt eine Knötchenbildung auf: dichte Zusammenlagerung der Zellen an einigen Stellen des Präparates, während die Kontrollkulturen (Abb. 13) gleichmässig an der Glaswand der Kulturflaschen wachsen. Vergr. 70x

Abb. 14: Die Knötchenbildung (vgl. Abb. 12) tritt auch bei solchen Zellen auf, die in der vorhergehenden Passage in Medium auf Rattenserum-Basis gezüchtet und dann in Medium mit Zusatz von Kälberserum verbracht wurden. Vergr. 70x

ß) Bei den Versuchen zur Adeninaufnahme durch Röntgen-bestrahlte Zellen zeigt sich, dass die Vierkantflaschen dafür nicht geeignet sind. Boden- und Deckfläche sind nicht eben, der hierdurch verursachte Fehler bei der Bestrahlung beträgt 10 %. Es werden daher die in der Gewebekultur allgemein gebrauchten Carrelflaschen mit einem Bodendurchmesser von 3,5 cm verwendet (Abb. 15).

Die Kulturmethode stimmt mit der der Vierkantflasche weitgehend überein, es wird jedoch für die Carrelflaschen je 1 ccm Medium zugesetzt. Zur Ablösung dieser Kulturen von der Flaschenwand wird 1 ml Trypsinlösung verwendet.

Bei den Methoden der Umsatzbestimmung am langsamen Roller-Apparat und bei stehenden Flaschen zeigt sich, dass die Zellen durch Trypsinieren bei der Auswertung verklumpen. Dies ergibt bei Messung der radioaktiven Strahlung eine erhebliche Fehlerquelle, da Selbstabsorption auftritt. Selbstabsorption zeigt sich in Abhängigkeit von:

Abb. 15: Carrelflaschen (Bodendurchmesser 3,5 cm) zur Züchtung von L-Zellen

Schichtdicke, Oberflächengrösse, Oberflächengestalt. Mit zunehmender Schichtdicke und Oberflächengrösse des Präparates steigt die Selbstabsorption, nur bei Verwendung einer unendlich dünnen Schicht kann dieser Fehler ausgeschaltet werden.

Es wird daher versucht, die Zellklumpen in dem Homogenisator "Atomixmill" zu zerkleinern und ihre radioaktive Strahlung im Vergleich zu verklumpten Zellen zu untersuchen:

Zu 1 Vierkantflasche einer L-Zell-Kultur werden 0,3 /uC/ml Adenin gegeben. Nach 24 Stunden wird die übliche Auswertung vorgenommen, wobei Zellklumpen und Trypsinlösung möglichst gleichmässig auf 2 Röhrchen verteilt werden. Nach dem 2. Zentrifugieren wird das Sediment eines Röhrchens in 1 ccm Aqua dest. aufgenommen. 5 x 2 Tropfen dieser Zellsuspension werden auf 5 gereinigte und gewogene Stahlplättchen verteilt, innerhalb des zentralen Ringes ausgestrichen, getrocknet, gewogen und im Methanzähler gemessen. - Das Sediment des 2. Röhrchens wird in 3 ccm Aqua dest. aufgenommen, 2 Min. auf vollen Touren homogenisiert. 5 x 2 Tr., 5 x 4 Tr. und

5 x 8 Tr. des Homogenates werden auf 15 Plättchen verteilt, ausgestrichen, getrocknet, gewogen und gemessen.

4. VERWENDETE MARKIERTE SUBSTANZEN:

a) Wässrige Lösung von Adeninsulfat 8-^{14}C Hemihydrat (Adenin 8-^{14}C x $\frac{1}{2}$ H_2SO_4 x $\frac{1}{2}$ H_2O, Radiochemical Centre, Amersham, England) mit einer Halbwertszeit von 5×10^3 Jahren: die Substanz wird nach einer Methode hergestellt, welche im wesentlichen mit der von Abrams und Clarke (20) übereinstimmt: sie wird hierbei durch Ringbildung von 4,5,6-Triamino-Pyrimidin in N-(formyl-^{14}C)-morpholin gebildet und durch Kristallisation aus 0,6 N Schwefelsäure gereinigt.

Die spezifische Aktivität beträgt 26,2 /uC/mg
die radiochemische Reinheit 99 %
die chemische Reinheit 97 %

Es werden jeweils 1,9 mg = 0,05 mC in 25 ccm Hankslösung aufgelöst und durch Seitz-Filtration sterilisiert. Die Substanz ist gut wasserlöslich.

Eine Schwierigkeit beim Arbeiten mit der markierten Adeninlösung liegt darin, dass sie sich sehr leicht, wahrscheinlich unter der Wirkung von UV-Strahlen, zersetzt. Trotz Aufbewahrung im Dunklen verloren wir eine beträchtliche Menge von markiertem Adenin auf diese Weise. Es wird jeweils nach dem Filtrieren und vor jedem neuen Versuch im Beckmann-Photometer gemessen.

Adeninsulfat hat eine charakteristische Absorption:
Max.: 261 m/u Min.: 228 m/u

Es wird jeweils der Bereich von 225 - 235 m/u und 255 - 265 m/u gemessen; bei Zersetzung zeigt sich eine starke Verschiebung der Werte oder ein Fehlen kennzeichnender Extinktionskoeffizienten.

Wegen dieser starken Tendenz der Adeninlösung zur Zersetzung wurde daran gedacht, dass sie sich auch unter den Versuchsbedingungen - 37,4° oder mechanische Wirkung des schnellen Roller-Apparates - zersetzt. Zur Klärung wurden photometrisch die Absorptionswerte folgender Lösungen bestimmt:

α) Reines Adenin, Kontrolle
ß) Aqua dest. + Adenin (Versuchskonzentration)
γ) Aqua dest. + Adenin ("), 24 Stden. im schnellen Roller
δ) Farbl. Hanks + Adenin (")
ε) Farbl. Hanks + Adenin ("), 24 Stden. im schnellen Roller

b) Es wird die Aufnahme von Guanin durch die Zellen im Vergleich zur Adeninaufnahme untersucht:

2,25 mg 0,05 mC 8-^{14}C-Guaninsulfat Monohydrat ($C_5H_5N_5Ox\frac{1}{2}H_2SO_4 xH_2O$), dargestellt mit der Methode von Weygand und Grosskinsky (21), sollen in 25 ccm Hanks lösung gelöst werden. Guanin ist jedoch unlöslich in Wasser, löslich nur in Alkalien und verd. Mineralsäuren. Bei vielen in der Literatur veröffentlichten Experimenten zur Guaninverwertung durch den tierischen Organismus (22, 23, 24) hatte diese Schwerlöslichkeit Schwierigkeiten bereitet. Bei Injektion in das Tier ist es jedoch möglich, das p_H nach der alkalischen Seite bis zur Lösung des Guanins zu verschieben -der lebende Organismus kann dies kompensieren-, während das p_H in der Gewebekultur innerhalb einer geringen Schwankungsbreite konstant gehalten werden muss.

α) Der erste Versuch wird mit Guanin unternommen, das in 25 ccm Hanks lösung suspendiert, auf 60° C erwärmt, 1/2 Stunde geschüttelt und nach 2 Stunden zur Sterilisation filtriert wurde. Bei der photometrischen Messung im Beckmann-Apparat ergeben sich folgende Werte:

Min.: 1,30 m/u (Soll: 1,42 m/u), Max: 1,08 m/u (Soll: 1,04 m/u)

(Bei der Guanin- und Thyminmessung ist nur die Bestimmung der Werte bei den Wellenlängen 250, 260 und 280 nötig, aus denen sich für das Minimum der Quotient $E\frac{250}{260}$, für das Max. $E\frac{280}{260}$ ergibt).

ß) Das bei der Sterilisation im Filter zurückgebliebene Guanin wird mit 98 ccm Hanks lösung herausgelöst; bei der Messung der Strahlung von zwei Tropfen dieser Lösung ergibt sich ein Wert von 5000/min. Da sich für das Filtrat eine Impulszahl von 50 000/Min. ergeben hatte und bei allen Versuchen mit gleichen Aktivitäten gearbeitet werden muss, sollen die 98 ccm Flüssigkeit auf 1/10 dieser Menge eingeengt werden. Zu diesem Zweck wird die Lösung lyophilisiert, d.h. tiefgefroren im Vakuum getrocknet, und die Trockensubstanz in 9,8 ccm Hanks lösung aufgenommen. Dabei fällt das in der 10-fachen Menge gelöst gewesene Guanin jedoch wieder aus und wird verworfen.

γ) Es werden Lösungsvermittler für die Lösung des Guanins erprobt: hochmolekulare, oberflächenaktive Verbindungen, die nach Vorhandensein oder Fehlen einer elektrischen Ladung am hydrophilen Teil des Moleküls in

1. ionogene ⇗ kationenaktive ⇘ anionenaktive
2. nichtionogene

} oberflächenaktive Stoffe

eingeteilt werden (25). Die ionogenen Verbindungen zeigen Tendenz zu Fällungen oder Denaturierung von Eiweissstoffen, während nichtionogene oberflächenaktive Stoffe dieses Reaktionsvermögen mit Proteinen nicht aufweisen.

Daher werden nur von dieser Gruppe einige Lösungsvermittler erprobt:

TWEEN 80 = Polyaethylenoxyd(20) sorbitanmonooleat.

Der Ausdruck "Polyaethylenoxyd(20)" bedeutet die Anzahl (= 20) der Aethylenoxydreste, entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 1000.

SPAN 20 = Ester des Sorbitans mit Laurinsäure
SPAN 80

2,3 mg Guanin werden im Mörser mit einem Tropfen des Lösungsvermittlers fein verrieben, tropfenweise Hanks lösung zugegeben, erwärmt und mit Hanks lösung auf 25 ccm aufgefüllt.

Es zeigt sich jedoch in keinem Fall eine Verbesserung der Löslichkeit.

5. VERSUCHSANORDNUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG DES ZELLSTOFFWECHSELS:

a) Zunächst ergab sich die Frage der Abhängigkeit der Aufnahme markierter Substanz von der Konzentration. Durch Zusatz inaktiven Adenins in wechselnder Konzentration versuchten wir, diese Beziehung festzustellen:
3 Kulturröhrchen mit je 5 ccm Zellsuspension erhielten folgende Zusätze:

Kultur 1: 0,4 /uC/ml ^{14}C-Adenin + 1 ccm Hankslösung
Kultur 2: 0,4 /uC/ml ^{14}C-Adenin + 1 ccm Hankslösung
Kultur 3: 0,4 /uC/ml ^{14}C-Adenin + 1 ccm inaktives Adenin (20 mg%)

Das inaktive Adenin wird vor der Verwendung im Beckmann-Apparat photometrisch kontrolliert.

b) Monojodessigsäure hemmt die Glycolyse auf der Stufe der Triosephosphatdehydrierung (26). Sie schädigt die Zellen auch morphologisch, im fixierten und gefärbten Präparat sind nach 24 Stunden fast nur noch helle, kernlose Zellschatten zu erkennen. Zur Erprobung der Stoffwechselhemmung wird Monojodacetat mit dem Adenin der Zellsuspension zugesetzt, gleichzeitig, um eine Verschiebung des pH nach der sauren Seite zu vermeiden, 1/10 der Gesamtflüssigkeitsmenge Phosphatpuffer.

Zur Bestimmung der Wirkung von Monojodessigsäure auf das Wachstum von L-Zellen werden die Fibroblasten aus 5 Vierkantflaschen mit 15 ccm Medium auf TCM-Basis auf 3 Rollerröhrchen verteilt. Die Kulturen erhalten folgende Zusätze:

Röhrchen 1: 0,75 ccm Monojodessigsäure
Röhrchen 2: 0,15 ccm Monojodessigsäure
Röhrchen 3: 0,03 ccm Monojodessigsäure

Nach 48-stündiger Kultur im schnellen Roller-Apparat werden die Zellen wieder in Vierkantflaschen gebracht und ihr weiteres Wachstum nach Fixation und Färbung eingelegter Deckgläschen beurteilt.

c) Colchicin hemmt die Funktion der Zellspindel bei der Mitose und bewirkt dadurch eine Arretierung der Zellen in der Metaphase. Möglicherweise beruht dies auf einer Hemmung der ATPase durch Colchicin, ATP wirkt stark toxisch und reduziert die Mitosenrate (27, 28).

R. Lettré (29) findet unter Zusatz von 0,02 /ug/ml Colchicin nach 24 Stunden ungefähr 30 % in der Teilung arretierte Zellen, H. Lettré, Krapp und Ochsenschläger (30) geben das Maximum der Arretierung für den Mäuse-Ascites-Tumor mit 10 - 13 Stunden an.

Wir verwendeten bei den anfänglichen Versuchen reines Colchicin, später das wirksamere, von H. Lettré 1941 durch Umsetzung von Colchicin mit Methylamin dargestellte N-Methylcolchicamid. Es werden in die Kulturflaschen bzw. -röhrchen beim Umsetzen Deckgläser eingelegt, Colchicin nach Anwachsen der Zellen in der gewünschten Konzentration zugesetzt, die Gläschen zu bestimmten Zeitpunkten entnommen, fixiert und gefärbt (Abb. 16).

Zur Untersuchung der Adeninaufnahme colchicinbehandelter Zellen wird folgendermassen vorgegangen:

Zu 5 ccm Zellsuspension im schnellen Roller-Apparat werden 1 γ/ml Colchicin und 0,3 /uC/ml ^{14}C-Adenin gegeben. Bei Wiederholung des Versuches in der stehenden Flasche wird, da sich das Maximum der Mitosearretierung bei ca. 20 Stunden gezeigt hatte, den Zellen 24 Stunden nach Zugabe von 0,05 γ/ml N-Methylcolchicamid 0,1 /uC/ml ^{14}C-Adenin zugesetzt. Die Auswertung wird nach 3, 6, 9, 24, 48 Stunden wie üblich vorgenommen.

d) Butazolidin (Diphenyl-dioxo-butyl-pyrazolidin) aktiviert nach Pulver, Exer und Hermann (31) die Atmung von Lebermitochondrien in geeigneter niedriger Konzentration, erst bei höherer Konzentration wird die Sauerstoffaufnahme gehemmt.

Wir verwendeten für die Adenin-Aufnahme-Versuche an L-Zellen Zusätze von 0,001 %, 0,01 %, 0,1 % und 1 % pro 5 ml Zellsuspension.

e) Röntgenstrahlen: In Anlehnung an die Versuche von Reid und Gifford (32) werden für die Bestrahlung von L-Zell-Kulturen folgende technische Daten gewählt:

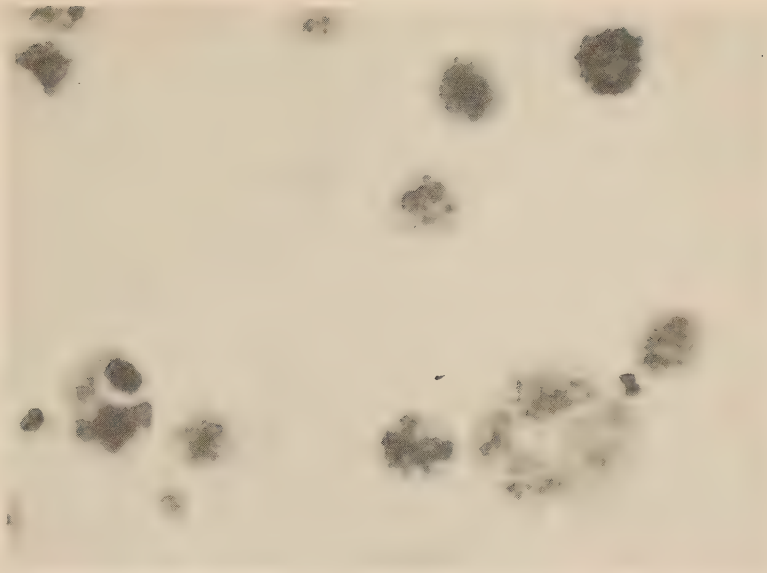


Abb. 16: L-Zellen nach Colchicinbehandlung (Vergr. 1000x): Die Fibroblasten sind abgekugelt als Ausdruck der Schädigung, mehrkernige Riesenzellen und durch die Colchicinwirkung arretierte Mitosen treten auf.

200 kV, 20 mA, Filtration: 1 mm Cu, Abstand Fokus-Glasoberfläche: 95 cm. Die Oberflächendosis, bezogen auf das Glasgefäss, beträgt für eine Serie 550 r, für die zweite 2200 r, so dass an der Kultur Dosen von 500 r bzw. 2000 r wirksam sind.

Die Zellen werden nach 24-stündigem Wachstum in Medium auf Embryonalextrakt-Basis in Carrelflaschen der Bestrahlung durch Röntgenstrahlen bei Zimmertemperatur ausgesetzt, die Kontrollserie ebenso dem Brutschrank entnommen und unter etwa gleichen Bedingungen aufbewahrt. Um die Strahlenwirkung deutlicher werden zu lassen, werden die Zellen vor Adeninzugabe noch 2 Stunden in den Brutschrank gebracht und darauf mit 0,2 /uC/ml Adenin versehen. Nach 3, 12, 24, 48 Stunden werden je 4 Flaschen wie beschrieben ausgewertet.

f) Hitzeinaktivierung: Nach der Loslösung der Zellen mittels Trypsinlösung wird die Suspension aus 2 Vierkantflaschen 1 Min. bei 750 Upm zentrifugiert. Das Sediment wird aufgenommen in 10 ccm Hankslösung und im Wa

serbad 10 Min. bei 100° C erhitzt. Danach wird die Suspension 1 Min. bei 750 Upm zentrifugiert. Die Zellen werden in Medium aufgenommen und weiter behandelt wie beschrieben.

C. VERSUCHSERGEBNISSE

1. AUFNAHME VON MARKIERTEM ADENIN DURCH L-ZELLEN:

a) Zur Frage der Zersetzung von Adenin:

Bei den Messungen zur Klärung einer eventuellen Zersetzung des Adenins unter den Versuchsbedingungen ergeben sich folgende Werte:

	Min.	Max.
α) Reines Adenin (Kontrolle)	230 m/u	260 m/u
ß) Aqua dest. + Adenin (Versuchskonz.)	234 m/u	260 m/u
γ) Aqua dest. + " , 24 Stden. im schnellen Roller	236 m/u	261 m/u
δ) Farbl. Hanks + Adenin (Versuchskonz.)	234 m/u	260 m/u
ε) Farbl. Hanks + " , 24 Stden im schnellen Roller	236 m/u	261 m/u

b) Aufnahme der markierten Base durch L-Zellen:

Bei Angebot einer Adeninaktivität von 0,3 /uC/ml an die Fibroblasten im sog. schnellen Roller-Apparat entsteht eine deutlich ansteigende Aufnahmekurve als Ausdruck für die intrazelluläre Anreicherung der markierten Substanz. Der Einbau hat bei 48 Stunden offenbar sein Maximum noch nicht erreicht (Abb. 17).

Auch in der stehenden Flasche ergibt sich bei Zugabe der gleichen Adeninmenge ein Einbau in die Zellen. Nach 24 Stunden zeigt sich beim statistischen Vergleich der Mittelwerte der intrazellulären Aktivität eine Steigerung der Aufnahme gegenüber dem 3-Stunden-Wert um 45 % (Abb. 18).

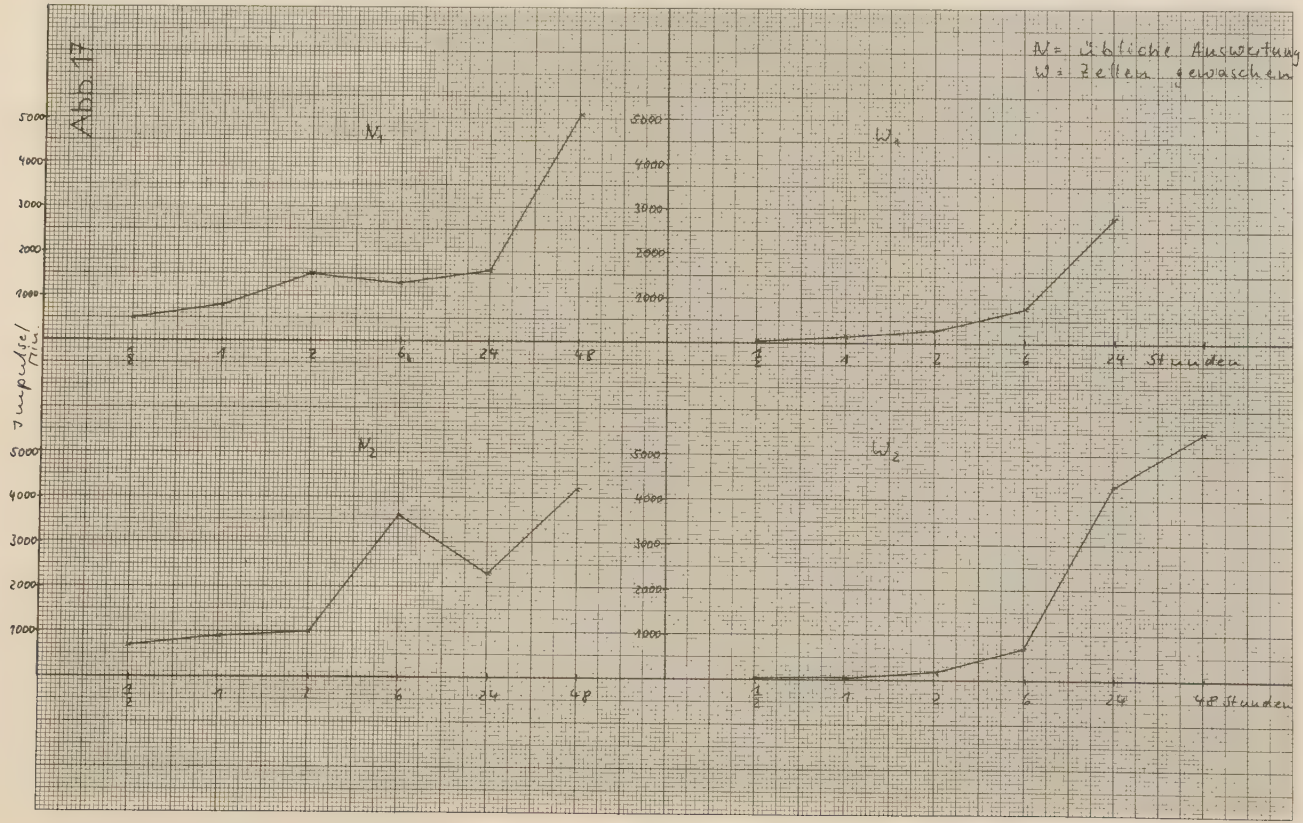


Abb. 11
N = übliche Auswertung
W = Zellen gewaschen
N1
W1
N2
W2
Impulse/min
5000
4000
3000
2000
1000
½
1
2
6
24
48
Stunden

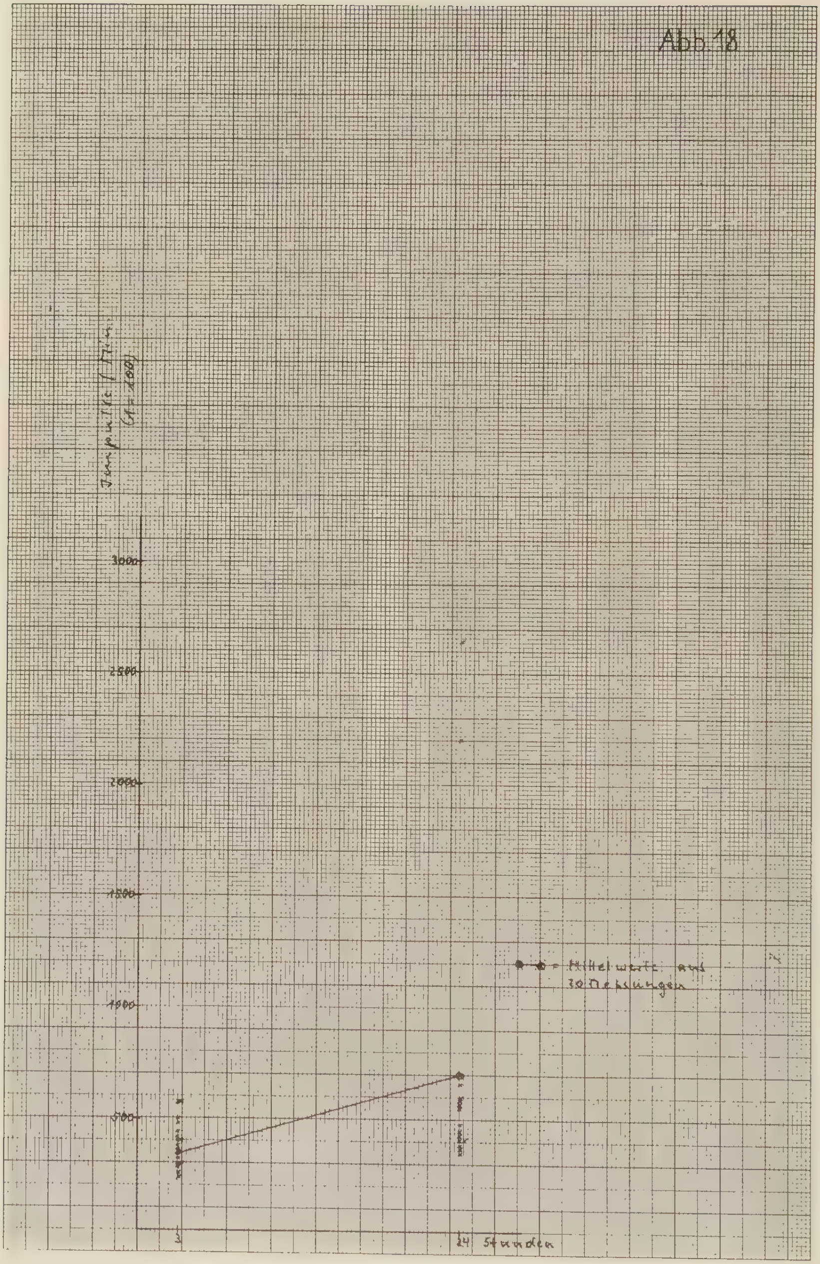


Abb 18
Impulse / Min. (1 = 100)
3000
2500
2000
1500
1000
500
= Mittelwerte aus 30 Messungen
3
24
Stunden

c) Bestimmung der günstigsten Adeninkonzentration für die Verwertung durch L-Zellen:

Um die für unsere Aufnahmeversuche günstigste Konzentration des Adenins herauszufinden, werden im vergleichenden Ansatz verschiedene Aktivitäten der Base zugesetzt. Es werden folgende Konzentrationen erprobt: 0,2, 1, 2, 4, 10, 20 /uC/6ml (Abb.19, 20, 21).

Bei der niedrigsten verwendeten Aktivität zeigt sich im schnellen Roller-Apparat das Maximum der Aufnahme nach 3 Stunden, dem ein dauernder Abfall bis zum kaum messbaren 48-Stunden-Wert folgt.

Bei den grösseren Adeninmengen steigt die Impulszahl der 3-Stunden-Messung proportional der verwendeten Aktivität, während die Aufnahmesteigerung des 48-Stunden-Wertes gegenüber dem 3-Stunden-Wert sich umgekehrt proportional zur angewandten Adeninmenge verhält:

Verwendete Aktivität:	Steigerung um:
1 /uC	95 %
2 /uC	90 %
4 /uC	75 %
10 /uC	69 %

Die für unsere Experimente brauchbarste Aktivität liegt bei 1,5 - 2 /uC/6ml. Diese Konzentration wird in der Folge ausschliesslich verwendet.

d) Angebot von inaktivem Adenin an L-Zellen:

Wenn sich die markierte und die inaktive Base biologisch gleichwertig sind, d.h. die Zelle bei der Verwertung der Substanzen zwischen beiden nicht unterscheidet, ist eine Senkung der Einbaukurve für das markierte bei gleichzeitigem Angebot von inaktivem Adenin zu erwarten:

Einer Zellsuspension wird 1 ccm einer 20 mg% inaktives Adenin enthaltenden Lösung zugegeben. Gleichzeitig wird dieser Kultur und 2 Kontrollansätzen 0,3 /uC/ml ^{14}C-Adenin zugesetzt. Es ergibt sich hierbei nach 48 Stunden eine Senkung von 90 % für die Aufnahme der markierten Substanz durch die Zellen, denen inaktives Adenin zugegeben war, gegenüber dem Mittelwert der Aufnahme markierter Substanz durch die beiden Kontrollkulturen (Abb.22).

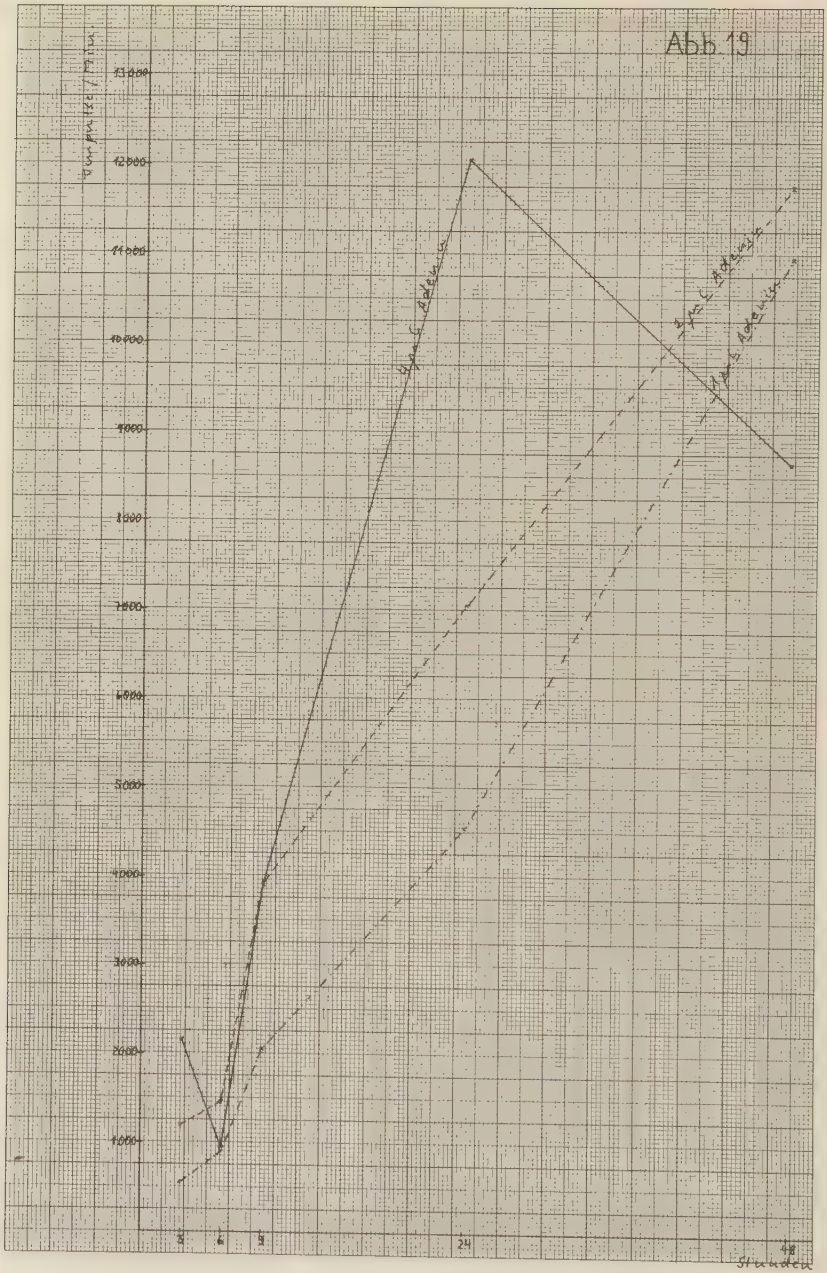


Abb. 19
Stunden
24
48

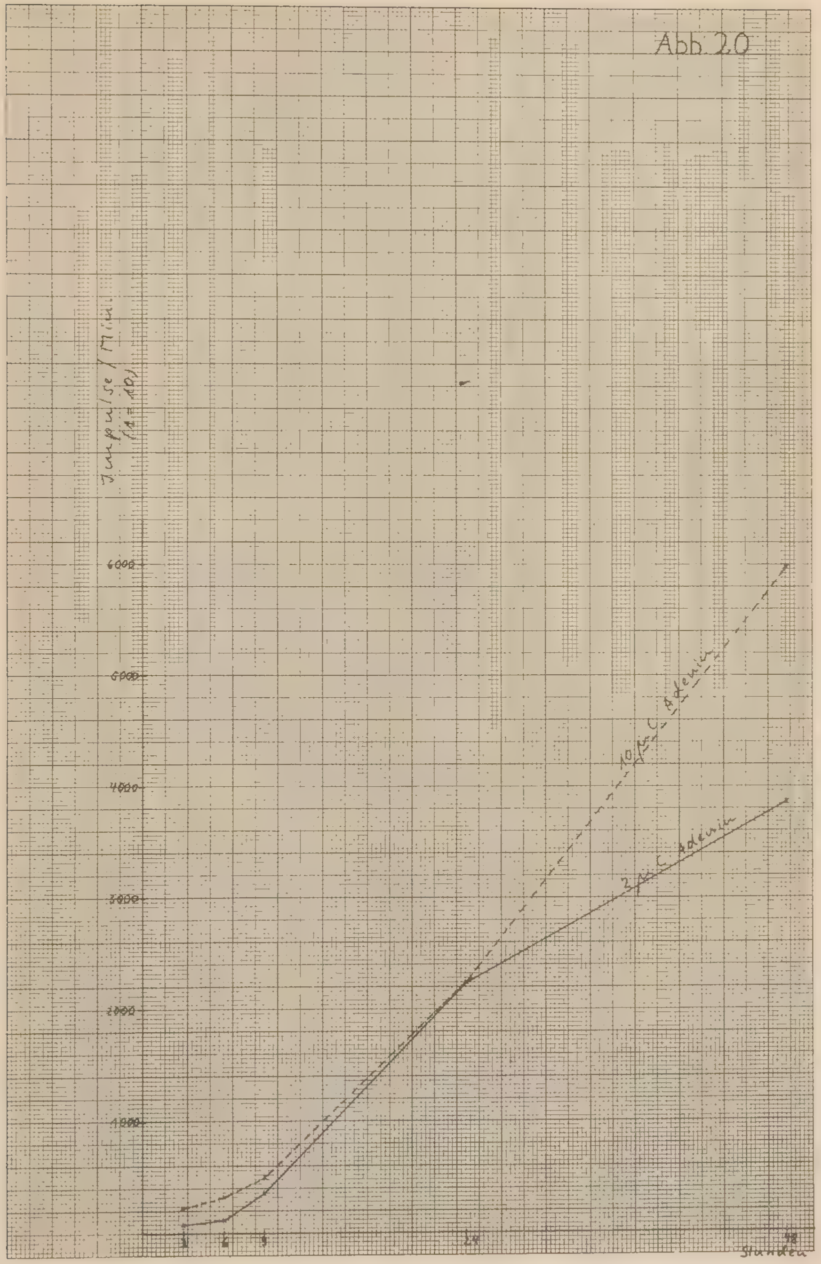
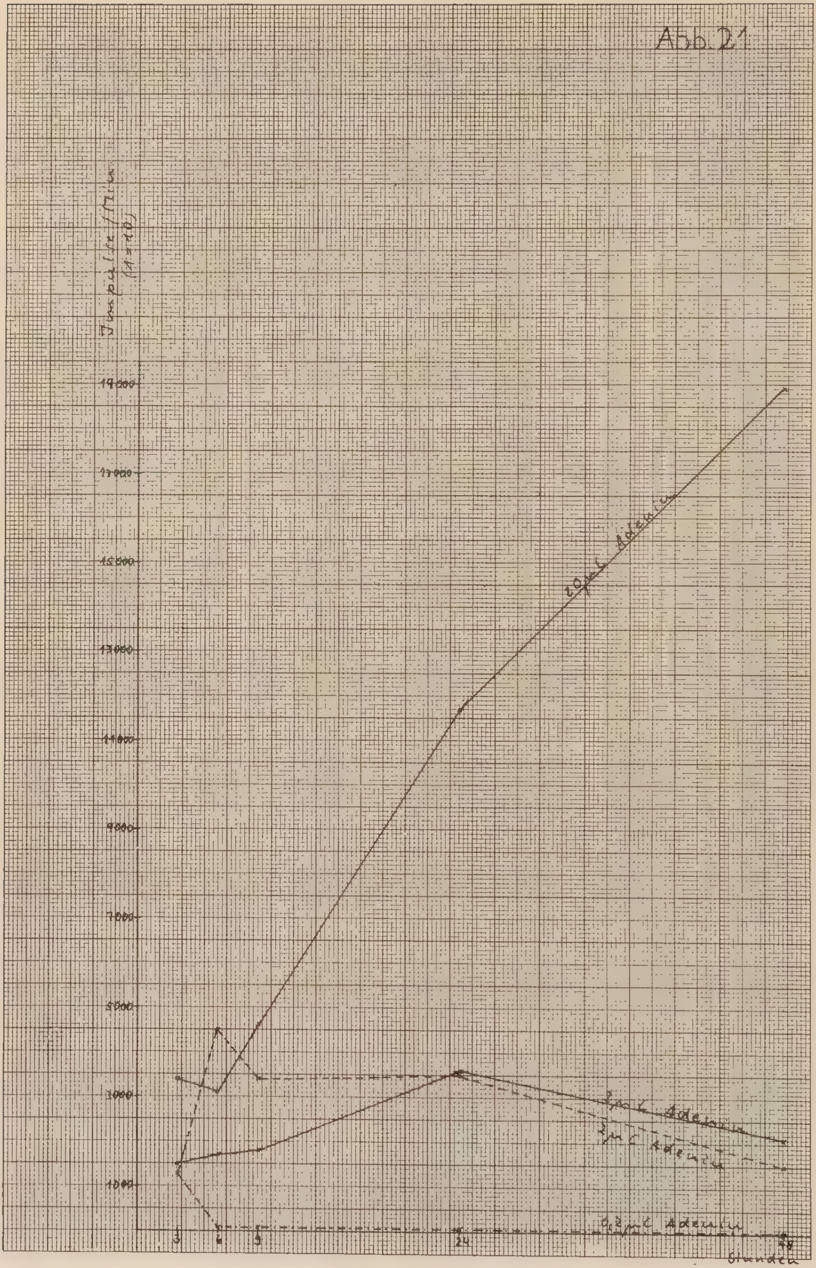


Abb. 20
Impulse / Min.
(1 = 10)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
1
2
3
24
48
Stunden
10 γ C Adenin
3 γ C Adenin


19000
17000
15000
13000
11000
9000
7000
5000
3000
1000
20 µl Adenin
2 µl Adenin
0,2 µl Adenin
3
6
9
24
48
Stunden
Abb. 21

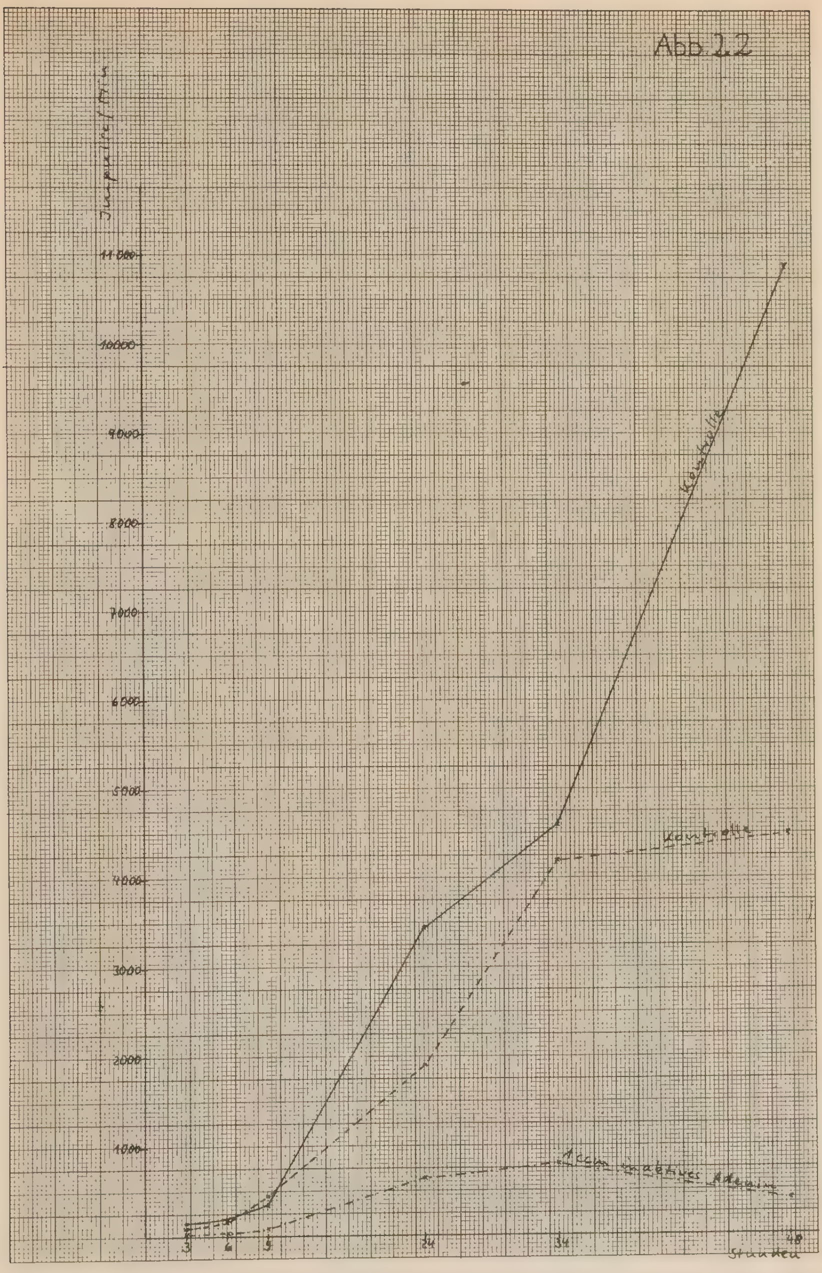


Abb 2.2
Impulse / min
11 000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
3
6
9
24
34
48
Stunden

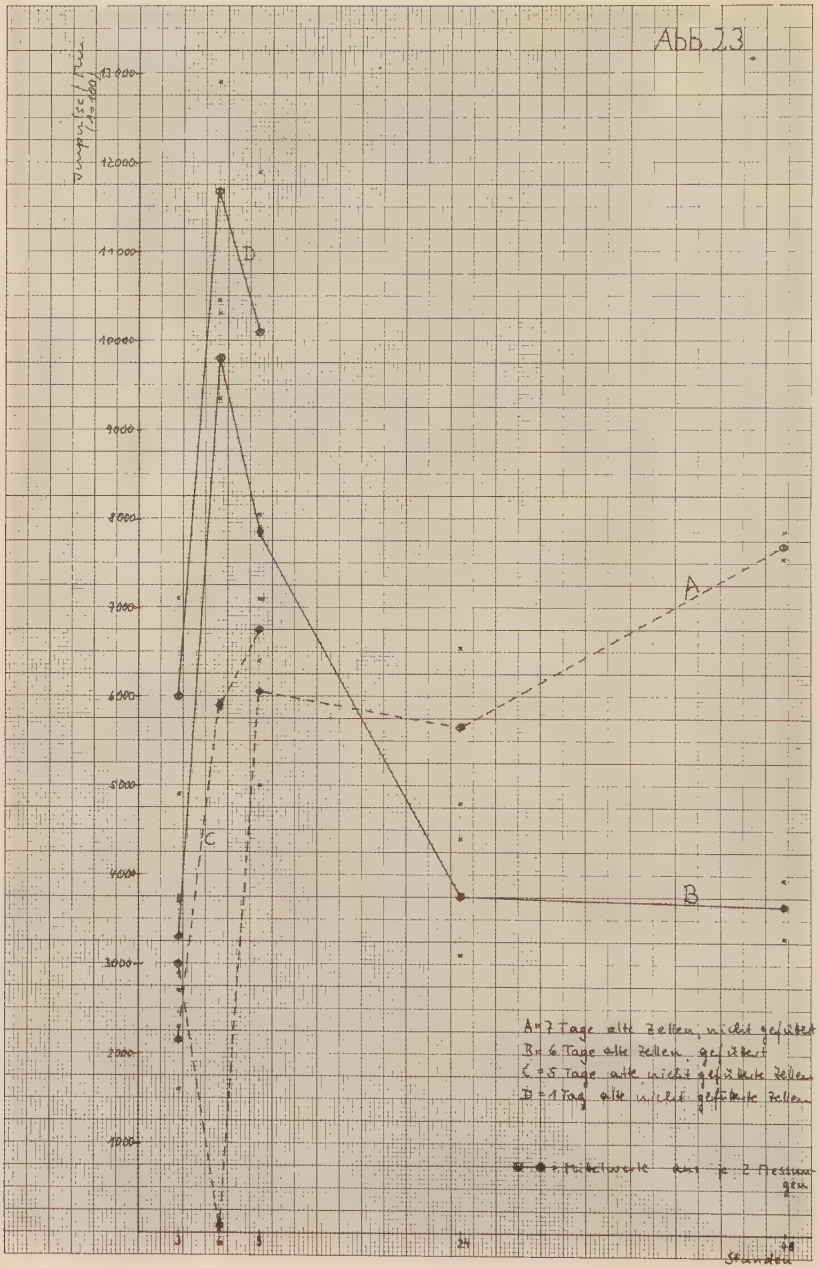


Abb. 2.3
Impulse/Min (1:100)
13000
12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
A
B
C
D
24
Stunden
A = 7 Tage alte Zellen, nicht gefüttert
B = 6 Tage alte Zellen, gefüttert
C = 5 Tage alte nicht gefütterte Zellen
D = 1 Tag alte nicht gefütterte Zellen
= Meßwerte aus je 2 Messungen

2. ABHÄNGIGKEIT DER ADENINAUFNAHME VOM BIOLOGISCHEN STADIUM DER ZELLE:

a) Unterschiede in der Stoffwechsellage von Fibroblasten zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Vermehrung in vitro:

Es werden Kulturen in der stehenden Flasche verwendet. Je 0,2 /uC/ml ^{14}C-Adenin werden Zellen folgenden "Alters" angeboten:

1 Tag alten (= 24 h nach dem Umsetzen)
5 Tage alten nicht gefütterten (= 5 Tage nach dem Umsetzen ohne Erneuerung der Nährlösung)
6 Tage alten gefütterten (= nach Abpipettieren des alten Mediums Zugabe der gleichen Menge frischer Nährlösung)
7 Tage alten nicht gefütterten

Die grösste Adeninaufnahme ergibt sich naturgemäss bei Verwendung der Fibroblasten einen Tag nach dem Umsetzen. 5 und 7 Tage alte, nicht gefütterte Zellen zeigen nach 9 Stunden einen Adenineinbau von 66 % bzw. 60 % des obigen Wertes, während 6 Tage alte, gefütterte Zellen zum gleichen Zeitpunkt 77 % der Aufnahme der 1-tägigen Zellen aufweisen (Abb. 23).

Es ergibt sich also bei L-Zellen proportional dem "Alter" ein Abfall der Kurve des Adenineinbaus. Dieser Abfall kann durch Angebot neuer Nährflüssigkeit aufgehalten bzw. in einen Kurvenanstieg umgekehrt werden.

b) Adeninangebot an hitzedenaturierte Zellen:

Mit der Annahme, dass Stoffumsatz und Syntheseleistung an die regelrechte Funktion zahlreicher Fermentsysteme gebunden sind, ist die Forderung verknüpft, dass stark geschädigte oder tote Zellen keine angebotenen Substanzen mehr aktiv aufnehmen.

Bei Zugabe von 0,3 /uC/ml ^{14}C-Adenin an hitzedenaturierte Zellen im schnellen Roller-Apparat zeigt sich nach 48 Stunden eine Aufnahme von 0,7 % des Wertes unbehandelter L-Zellen (Abb. 24). Dieser geringe Wert ist nicht auf eine wirkliche Aufnahme der markierten Substanz durch hitzedenaturierte Zellen zurückzuführen, sondern auf radioaktive Spuren, die den Zellen äusserlich anhaften.

Damit ist die Abhängigkeit des Substanzeinbaus von der biologischen Intaktheit der Zelle bewiesen, die als eine der wichtigsten Voraussetzungen für Versuche zur Aufnahme markierter Stoffe gilt.

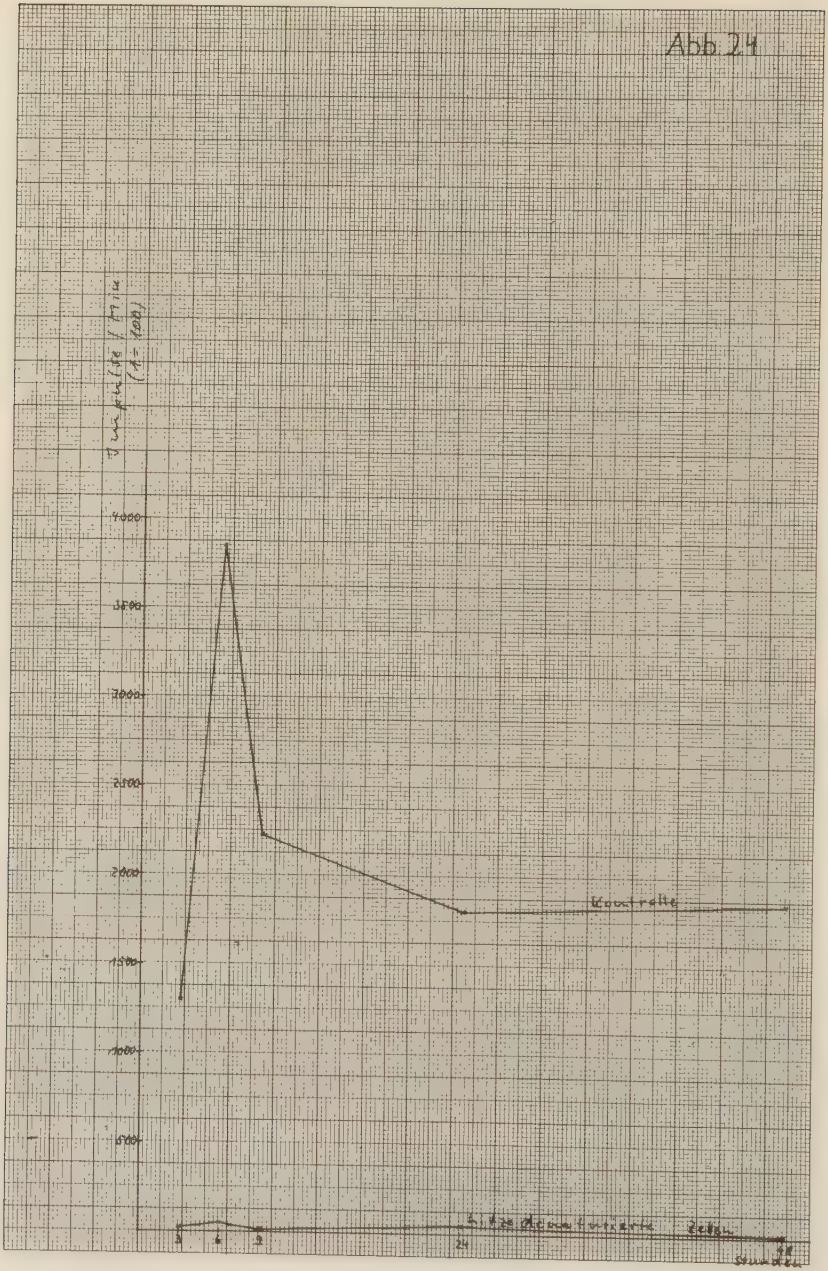


Abb. 24
Kontrolle

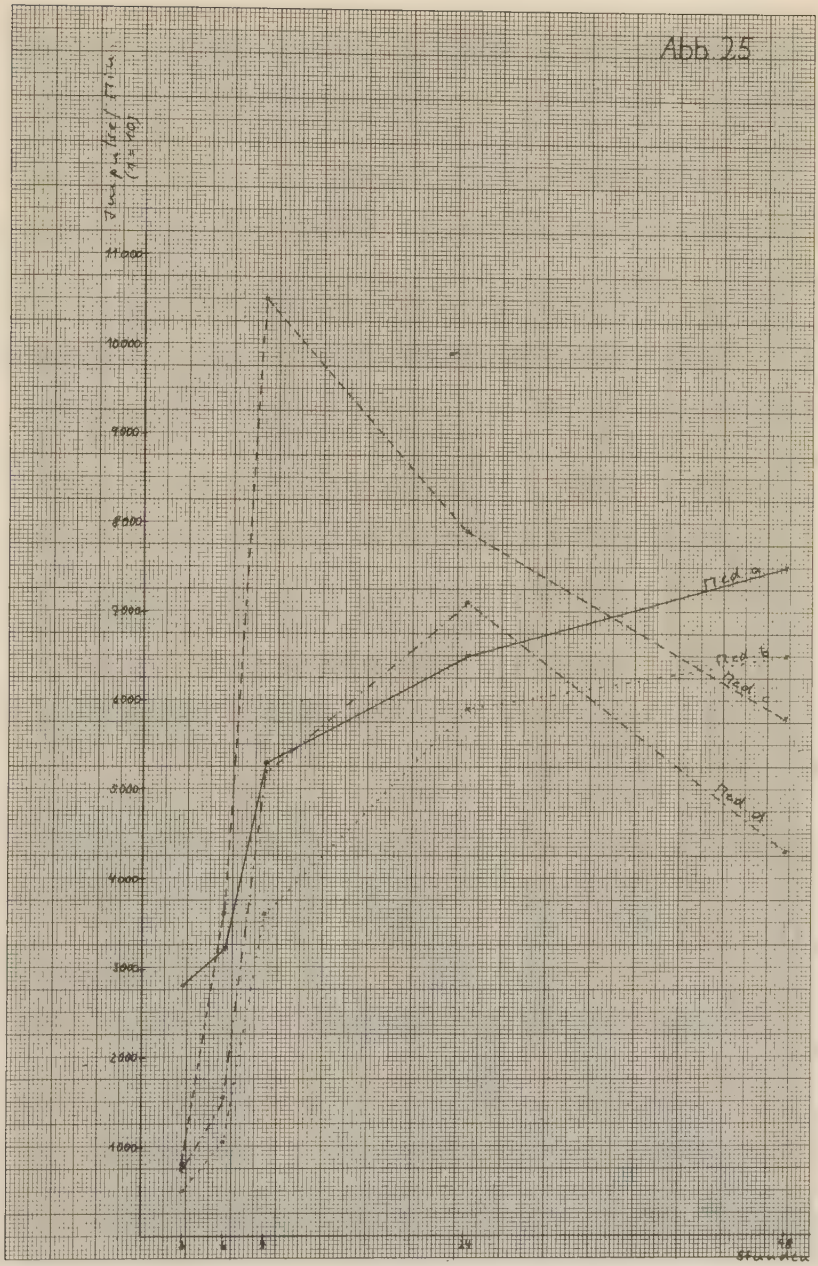


Abb. 25
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
24
48
Stunden

c) Adeninaufnahme durch Zellen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Nährmediums:

Für 4 verschiedene Kulturröhrchen von Zellsuspension im schnellen Roller-Apparat werden unterschiedliche Medien verwendet:

Medium a: 5 % KS, 5 % EE, 90 % Hanks lösung
Medium b: 20 % KS, 80 % TCM
Medium c: 5 % KS, 30 % TCM, 65 % Hanks lösung
Medium d: 20 % KS, 10 % EE, 70 % Hanks lösung

Nach 3 Stunden liegt der Messwert für die Zellen in Medium a, das die wenigsten Nährstoffe enthält, am höchsten (Abb. 25), nach 48 Stunden ergeben sich folgende Impulszahlen, ausgedrückt in % des höchsten Aufnahmewertes:

Medium a: 100 %
Medium b: 87 %
Medium c: 78 %
Medium d: 58 %

d) Adeninaufnahme durch Zellen in Nährlösungen mit Zusatz von Blutserum verschiedener Spendertierarten:

Blutseren von Mensch, Kalb, Ratte und Maus werden vergleichsweise erprobt. Das zu erprobende Serum wird dabei jeweils zu 20 % dem synthetischen Nährmedium zugesetzt.

Als optimal im Sinne der höchsten Stoffwechselrate erweist sich das üblicherweise zur Züchtung verwendete Kälberserum. 86 % dieses höchsten Aufnahmewertes weisen nach 24 Stunden die Zellen im homologen Mäuseserum auf, in Rattenserum beträgt der Wert 69 %. Im Gegensatz dazu zeigt sich in Menschenserum ein weit geringerer Adenineinbau: nur 1 % der Aufnahme in Kälberserum findet hier statt; die Zellen sind stark verklumpt und lösen sich erst nach 48 Stunden etwas, was in einem leicht gesteigerten Einbau des Isotops zu diesem Zeitpunkt zum Ausdruck kommt (Abb. 26).

e) Adeninaufnahme durch Zellen nach längerer Kultur in Medium unter Zusatz von Rattenserum:

Offenbar bedarf es längerer Einwirkung bestimmter Serumfaktoren, um fassbare Stoffwechseländerungen in kultivierten L-Zellen zu induzieren. Es wurden daher Kulturlinien von L-Zellen über 2 Monate mit einem Zusatz von Blutserum weisser Ratten gehalten. Das Nährmedium setzte sich folgendermassen zusammen:

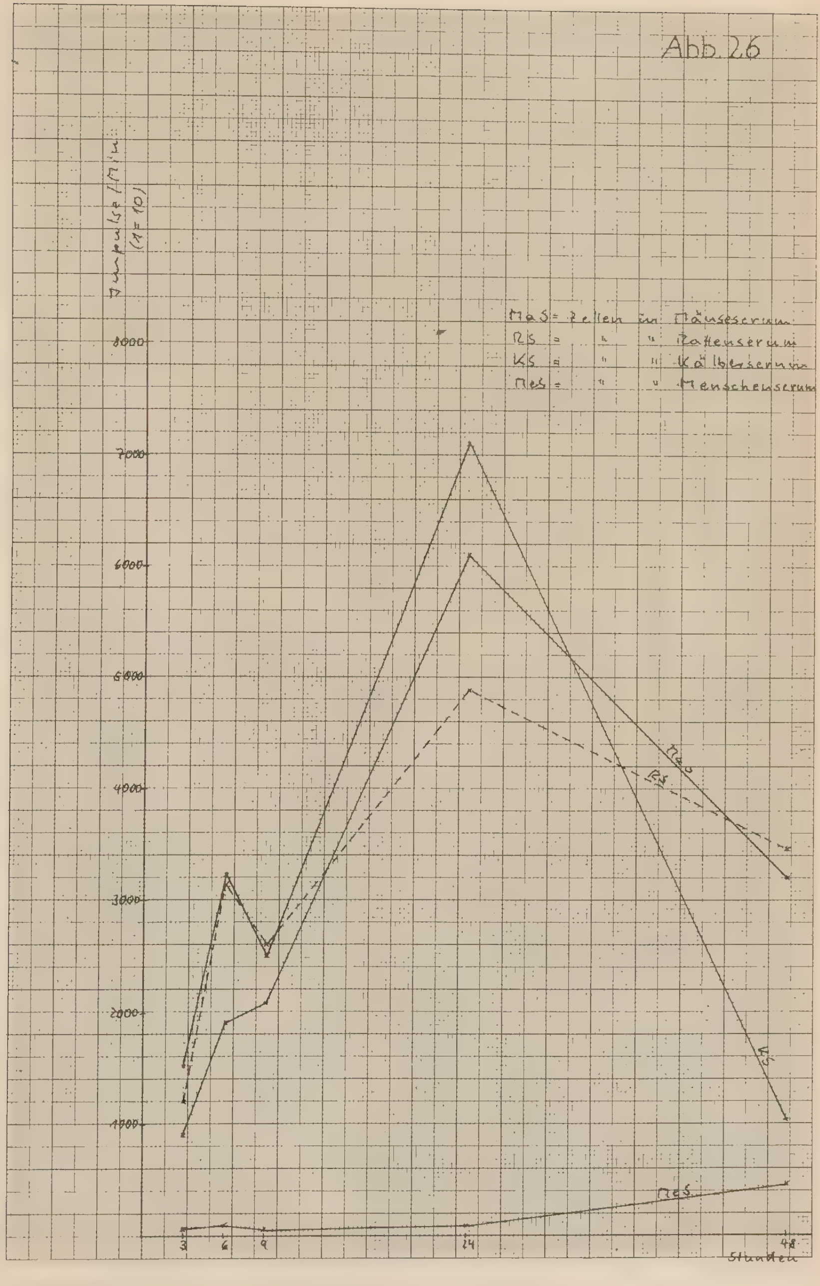


Abb. 26
Impulse/Min. (1 = 10)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
MaS = Zellen im Mäuseserum
RS = " " Rattenserum
KS = " " Kälberserum
MeS = " " Menschenserum
MeS
RS
KS
MeS
3
6
9
24
48
Stunden

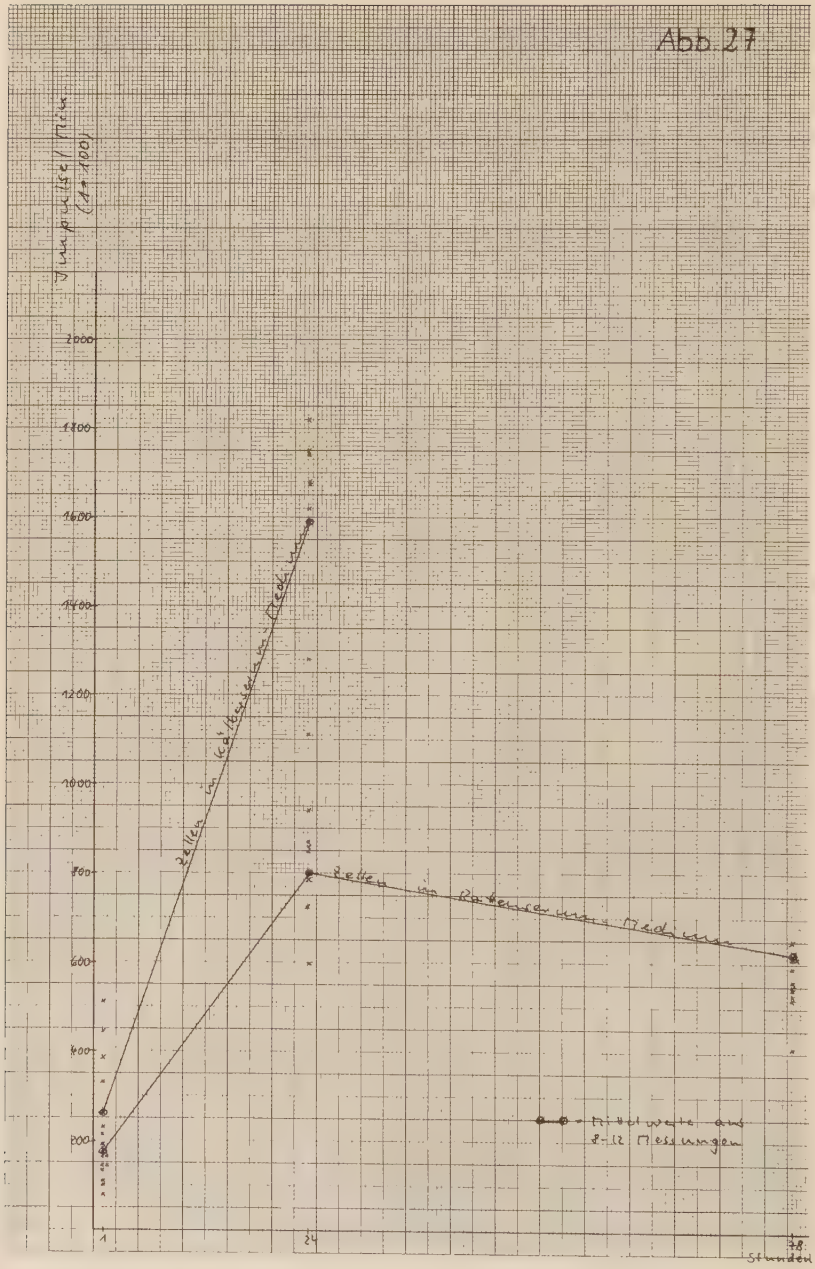


Abb. 27
Impulse / min (Δ = 100)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
1
24
48
Stunden
Zellen in Kalbserum + Medium
Zellen in Rinderserum + Medium
= Mittelwerte aus 8-12 Messungen

10 % Embryonalextrakt, 20 % Rattenserum, 70 % Hanks lösung.

Beim Adeninaufnahmeversuch (Abb. 27) ergibt sich 24 Stunden nach Adeninzusatz 50 % des Einbauwertes der in Kälberserum gezüchteten Kontrollkulturen.

Bei der morphologischen Beurteilung der in Rattenserum gezüchteten L-Zellen ergibt sich subjektiv, dass

α) in den Präparaten der in Rattenserum gezüchteten Fibroblasten mehr Mitosen vorhanden sind als bei den in Kälberserum kultivierten Zellen (Abb. 28)

ß) die aus dem Rattenserum-Medium in Medium auf Kälberserum-Basis zurückgesetzten Zellen sehr protoplasmaarm sind und ungewöhnlich lange, dünne Fortsätze aufweisen (Abb. 29 und 30)

γ) die an der Innenwand der Vierkantflasche makroskopisch sichtbare Zellschicht bei den in einem Medium mit Zusatz von Rattenserum kultivierten Zellen viel dichter ist als bei den in Kälberserum-Medium gezüchteten

δ) die in Medium auf Rattenserum-Basis gezüchteten Zellen z. T. in unregelmässigen Mustern wachsen, während die in Kälberserum-Medium kultivierten Zellen die Glaswand gleichmässig bedecken

ε) die in Rattenserum-Medium gezüchteten Zellen weit schlechter beim Zentrifugieren sedimentieren als die in Kälberserum-Medium kultivierten.

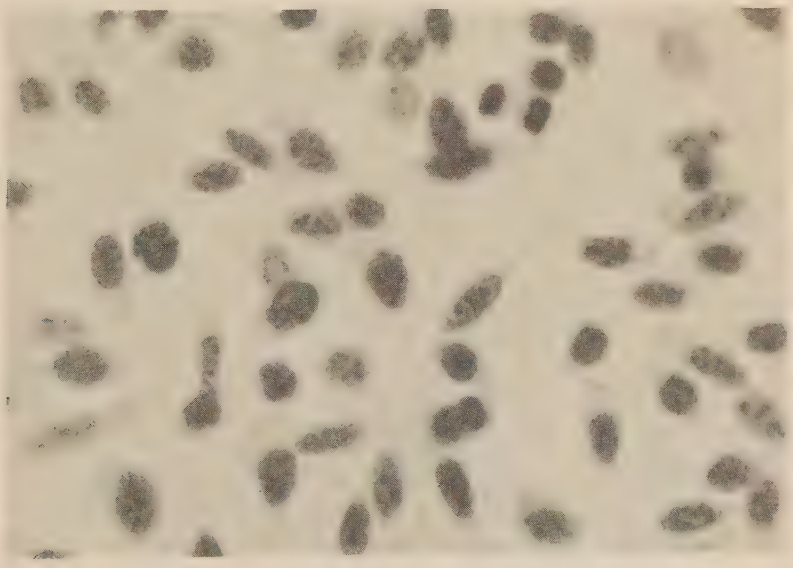


Abb. 28: L-Zellen nach 4-tägiger Züchtung in Medium unter Zusatz von Rattenserum: vermehrtes Auftreten von Mitosen gegenüber der Kontrollkultur (Abb. 6). Vergr. 750x

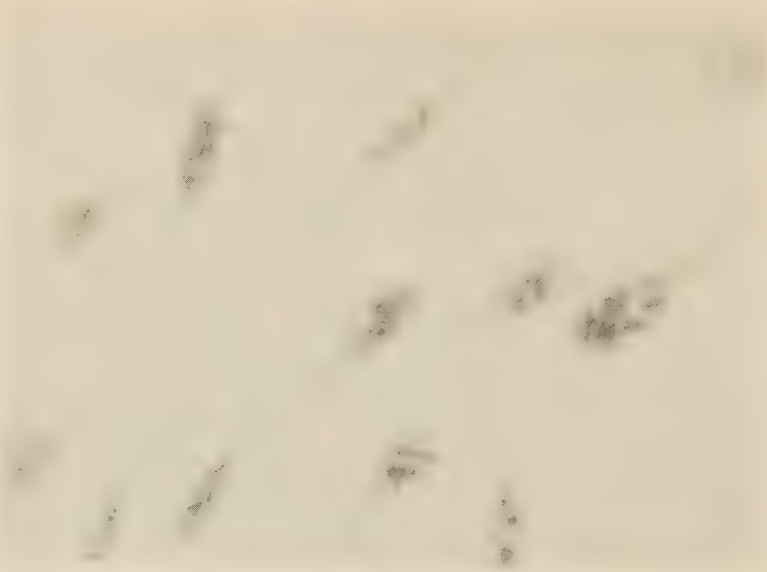


Abb. 29: L-Zellen nach Züchtung über mehrere Passagen in Medium auf Rattenserum-Basis, anschliessend Verbringen in Kälberserum-Medium. Die Zellen sind sehr protoplasmaarm und weisen lange, dünne Fortsätze auf (Kontrolle: Abb. 30). Vergr. 750x

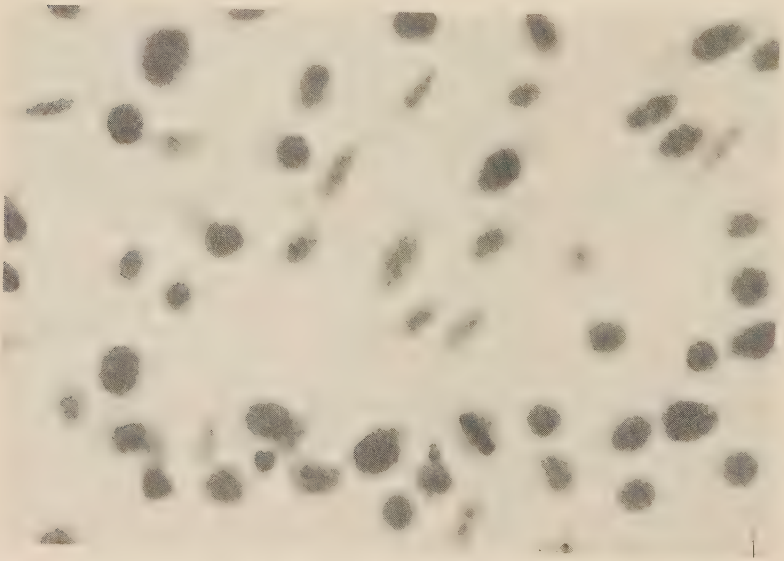


Abb. 30: Kontrolle zu Abb. 29. Vergr. 750x

3. WIRKUNG CHEMISCHER UND PHYSIKALISCHER FAKTOREN AUF DIE ADENINAUFNAHME DURCH ZELLEN IN VITRO:

a) Wirkung von Monojodessigsäure (MES) auf L-Zellen und Zellen des Mäuseascitestumors in vitro:

MES hemmt die Glycolyse auf der Stufe der Triosephosphatdehydrierung. In mehreren Versuchen zeigt sich nach Zugabe von MES zu L-Zell-Suspensionen eine Hemmung der Adeninaufnahme, deren Grad der Konzentration der MES annähernd parallel ist.

Bei Untersuchung der Frage, ob der Zeitpunkt der MES-Zugabe für die Verwertung des Adenin Bedeutung hat, wird folgendermassen vorgegangen:

Zu 2 Röhrchen Zellsuspension werden 0,03 bzw. 0,15 ccm 0,01 molare MES gegeben, 2 Stunden später je 0,25 /uC/ml Adenin, zum gleichen Zeitpunkt in 2 weitere Röhrchen gleichzeitig 0,03 bzw. 0,15 ccm MES und je 0,25 /uC/ml Adenin. Ein 5. Röhrchen mit 0,25 /uC/ml der Base, zugesetzt zu der Zellsuspension, dient als Kontrolle.

Es zeigt sich eine unterschiedliche Wirkung der beiden Konzentrationen auf die Zellen im schnellen Roller-Apparat:

Bei Verwendung der niedrigeren Monojodessigsäure-Konzentration beträgt die Aufnahme des Isotops nach 9 Stunden 75 %, bei Verwendung von 0,15 ccm MES 3 % des Kontrollwertes. Es lässt sich hierbei kein Unterschied im Kurvenverlauf je nach dem Zeitpunkt der MES-Zugabe feststellen (Abb. 31).

In einem weiteren Experiment im schnellen Roller-Apparat (Abb. 32) ergibt sich 9 Stunden nach Zugabe von 0,03 ccm MES eine Aufnahme von 89 %, durch 0,15 ccm MES 12 %, durch 0,75 ccm MES 23 % des Kontrollwertes.

An der Kultur in der stehenden Flasche beträgt nach Zugabe von 0,3 /uC/ml ^{14}C-Adenin und 0,2 ccm MES nach 50 Stunden die Adeninaufnahme 0,05%, nach Zugabe von 0,03 ccm MES 0,2 % des Kontrollwertes (Abb. 33).

Die Wirkung von Monojodessigsäure wird ebenfalls an Suspensionen des Mäuseascitestumors untersucht (Abb. 34): Bei Verwendung von 0,03 bzw. 0,1 ccm MES und 0,3 /uC/ml ^{14}C-Adenin zeigt sich ein deutlicher Abfall des Adenineinbaus der mit Monojodacetat behandelten Zellen gegenüber den Kontrollkulturen. Nach 24 Stunden beträgt der Aufnahmewert bei den mit der niederen MES-Konzentration behandelten Zellen 26 %, bei den mit 0,1 ccm MES behandelten 13 % des Kontrollwertes.

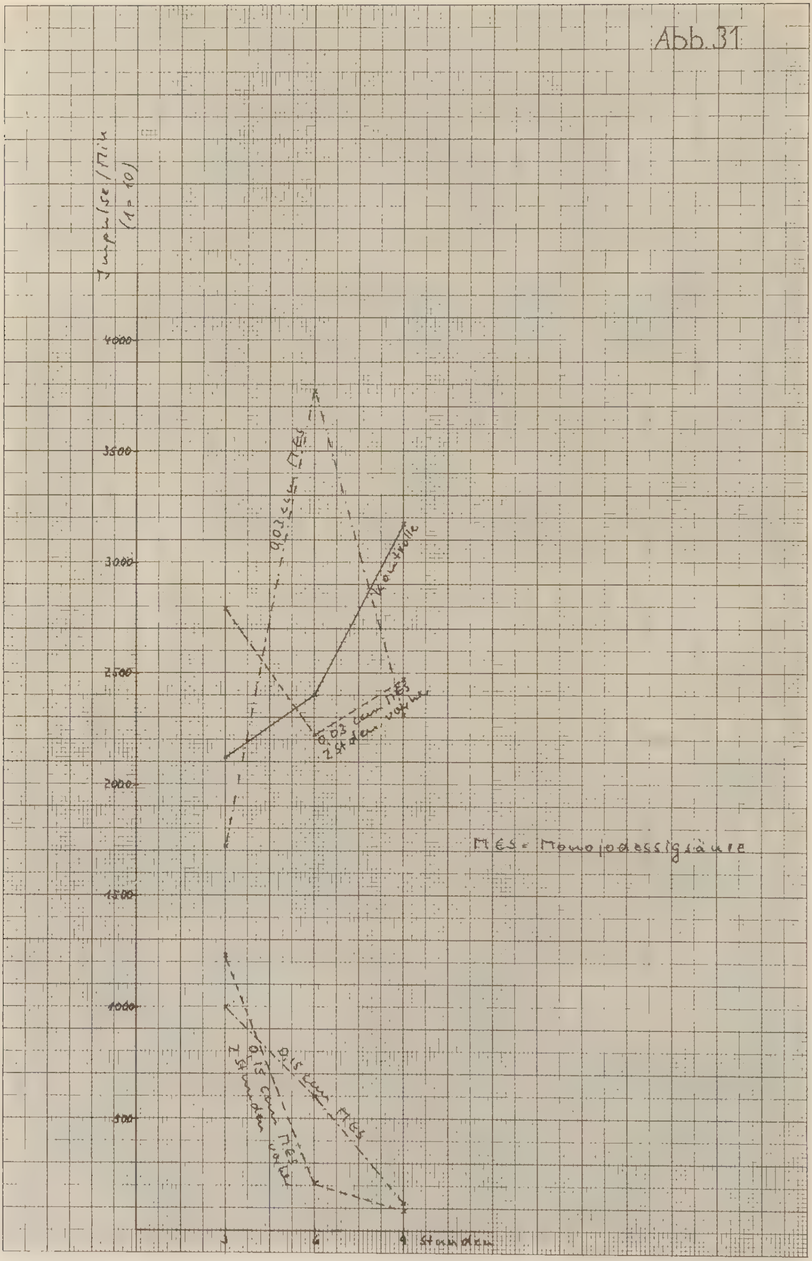

Impulse/Min
(1 = 10)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
3
6
9
Stunden
0,03 ccm MES
Kontrolle
0,03 ccm MES 2 Stunden vorher
0,15 ccm MES
0,15 ccm MES 1 Stunden vorher
MES = Monojodessigsäure

Abb.31

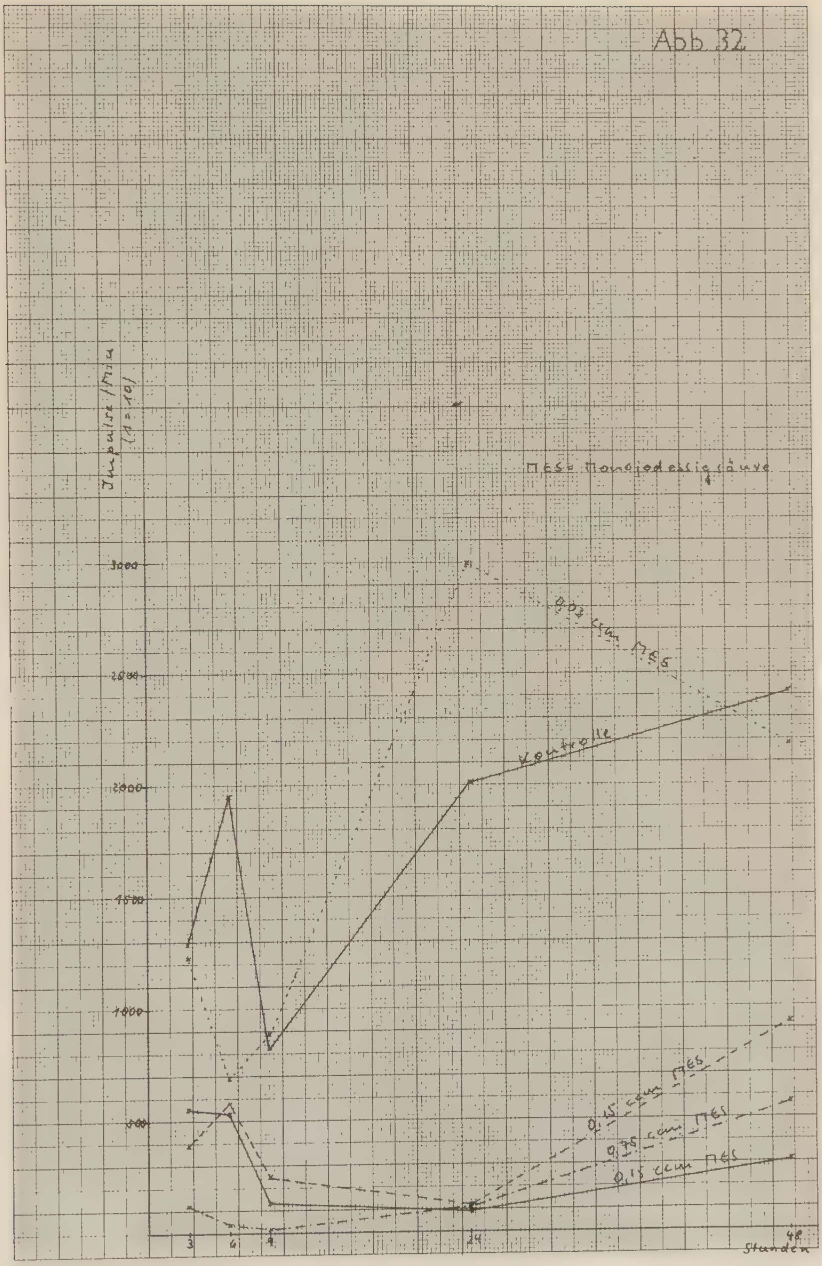


Abb. 32
Impulse / Min (1 = 10)
MES = Monojodessigsäure
3000
2000
1500
1000
500
0,03 ccm MES
Kontrolle
0,15 ccm MES
0,75 ccm MES
0,15 ccm MES
3
6
9
24
48
Stunden

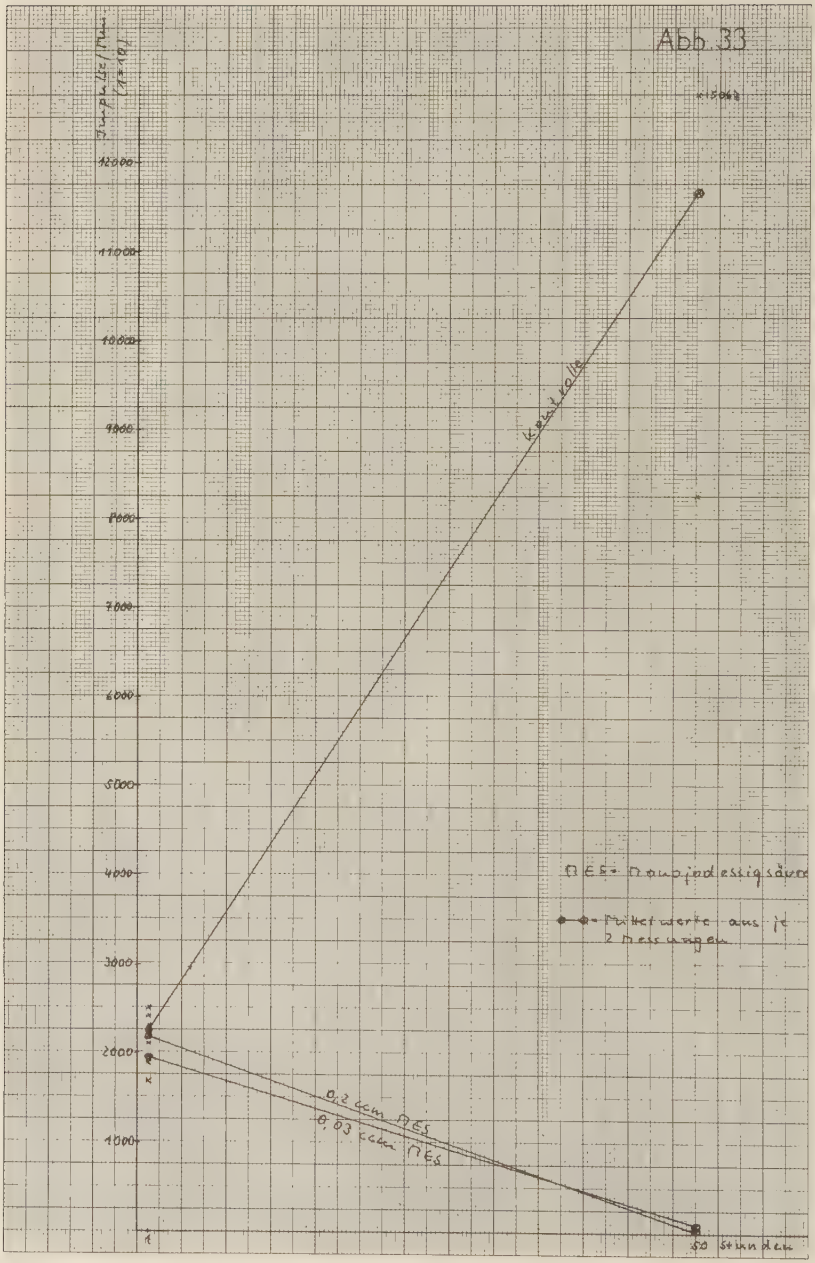


Abb. 33
Kontrolle
0,2 ccm MES
0,03 ccm MES
50 Stunden

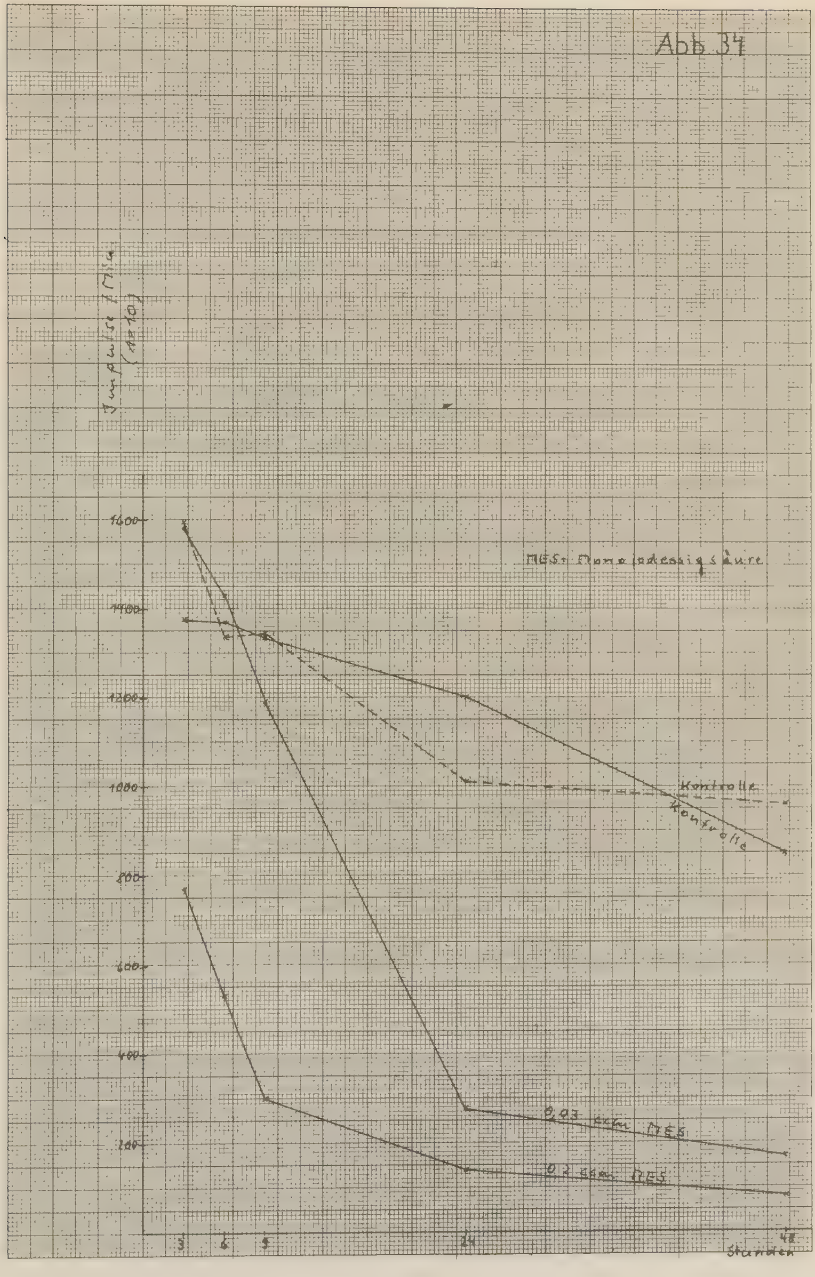


Abb 34
Impulse / Min (1:10)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
MES + Monojodessigsäure
Kontrolle
Kontrolle
0,03 mMol MES
0,2 mMol MES
3
6
9
24
48
Stunden

b) Wirkung von Butazolidin:

Nach Wrba (1) intensiviert eine Dosis von 10 mg% Butazolidin an Zellsuspensionen des Ehrlichschen Mäuseascitestumors auf Grund einer Atmungssteigerung den oxydativen Abbau der Glucose, während die hohe Konzentration von 1 g% im Suspensionsmittel in der gleichen Zellpopulation einen erheblichen Hemmeffekt hat.

An Mäusefibroblasten zeigt sich 24 Stunden nach Zusatz von 0,1 g% Butazolidin eine Adeninaufnahme von 10 %, bei Zugabe von 10 mg% ein Einbau von 120 % des Kontrollwertes (Abb. 35 und 36).

c) Wirkung von Colchicin:

48 Stunden nach Zugabe von 1 γ/ml Colchicin und 0,3 /uC/ml ^{14}C-Adenin zu L-Zell-Kulturen im schnellen Roller-Apparat findet sich ein Einbau der markierten Base von 50 % des Kontrollwertes (Abb. 37). Der Verlauf des Aktivitätseinbaus von 3 bis 48 Stunden nach Zugabe des Colchicins ist charakteristisch: zunächst ergibt sich eine deutliche Verwertung des Adenins, die meisten Zellen befinden sich in der Interphase, während nach 9 Stunden ein Stillstand des Einbaus deutlich wird. Mit Eintritt in die Prophase und Hemmung der weiteren Teilung geht die Fähigkeit der Zellen zur Nucleinsäuresynthese verloren. Nach 24 Stunden wird der Absterbegradient der geschädigten Fibroblasten deutlich.

Die Wiederholung des Versuches mit L-Zell-Kulturen in der stehenden Flasche (Abb. 38) unter Zusatz von 0,05 γ/ml N-Methylcolchicamid und 0,1 /uC/ml Adenin ergibt nach 48 Stunden eine Steigerung der Adeninaufnahme der colchicinbehandelten Zellen um 5 % gegenüber dem Kontrollwert.

d) Wirkung von Röntgenstrahlen auf L-Zellen:

Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf den Adenineinbau in L-Zellen wird in 2 Dosierungen untersucht. Wir verwenden Dosen von 500 r bzw. 2000 r Es ergibt sich, dass die gewählten Strahlen von 180 kV im Versuchszeitraum von 48 Stunden nur relativ geringe Wirkung auf die DNS-Synthese ausüben. Bei Zusatz von 0,1 /uC/ml an markiertem Adenin liegt der Mittelwert der Aufnahme für die höchste Röntgendosis (2000 r) bei 73 % des Wertes unbehandelter Kulturen. Der Durchschnitt für die intrazelluläre Aktivität von 4 mit 500 r bestrahlten Kulturen liegt bei 83 % der nichtbestrahlten Kontrollkulturen liegt bei 83 % der nichtbestrahlten Kontrollkulturen (Abb. 39).

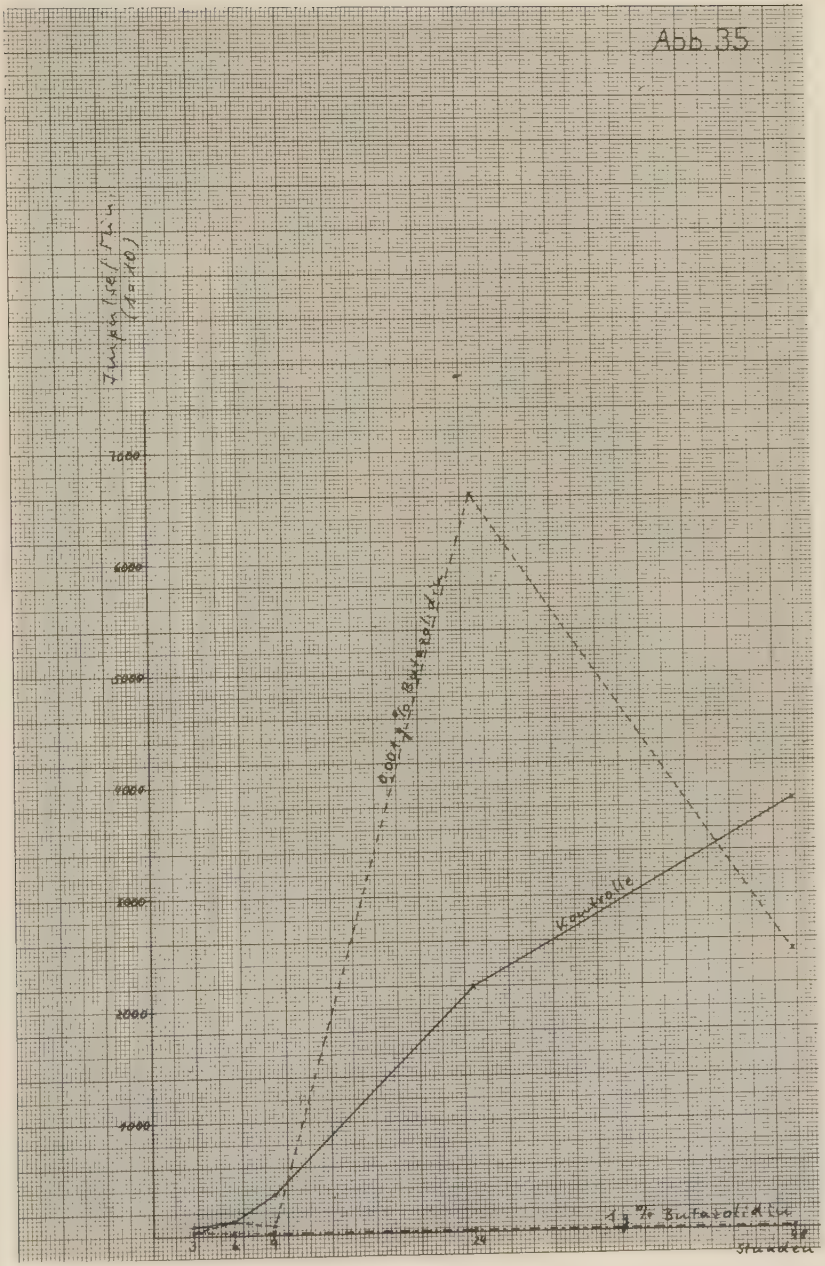


Abb. 35
Kontrolle
Stunden

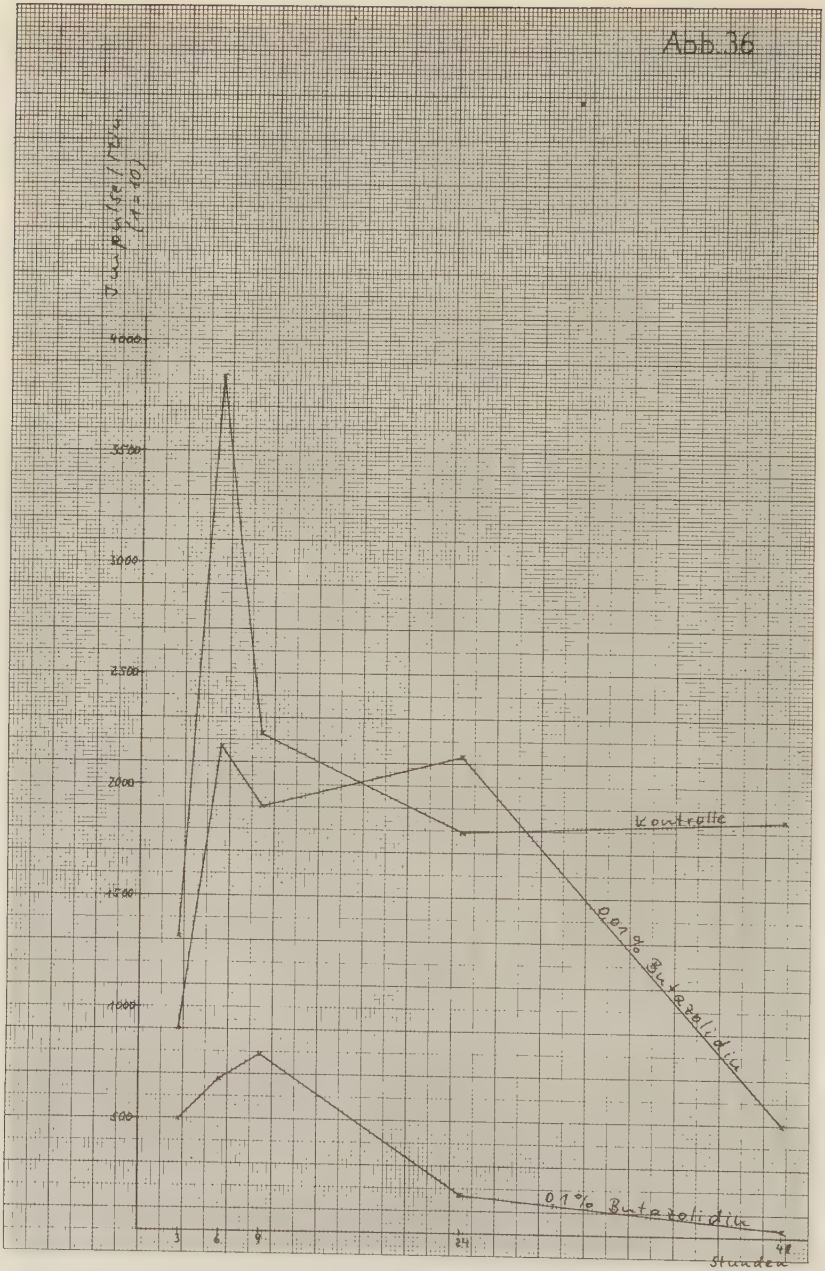
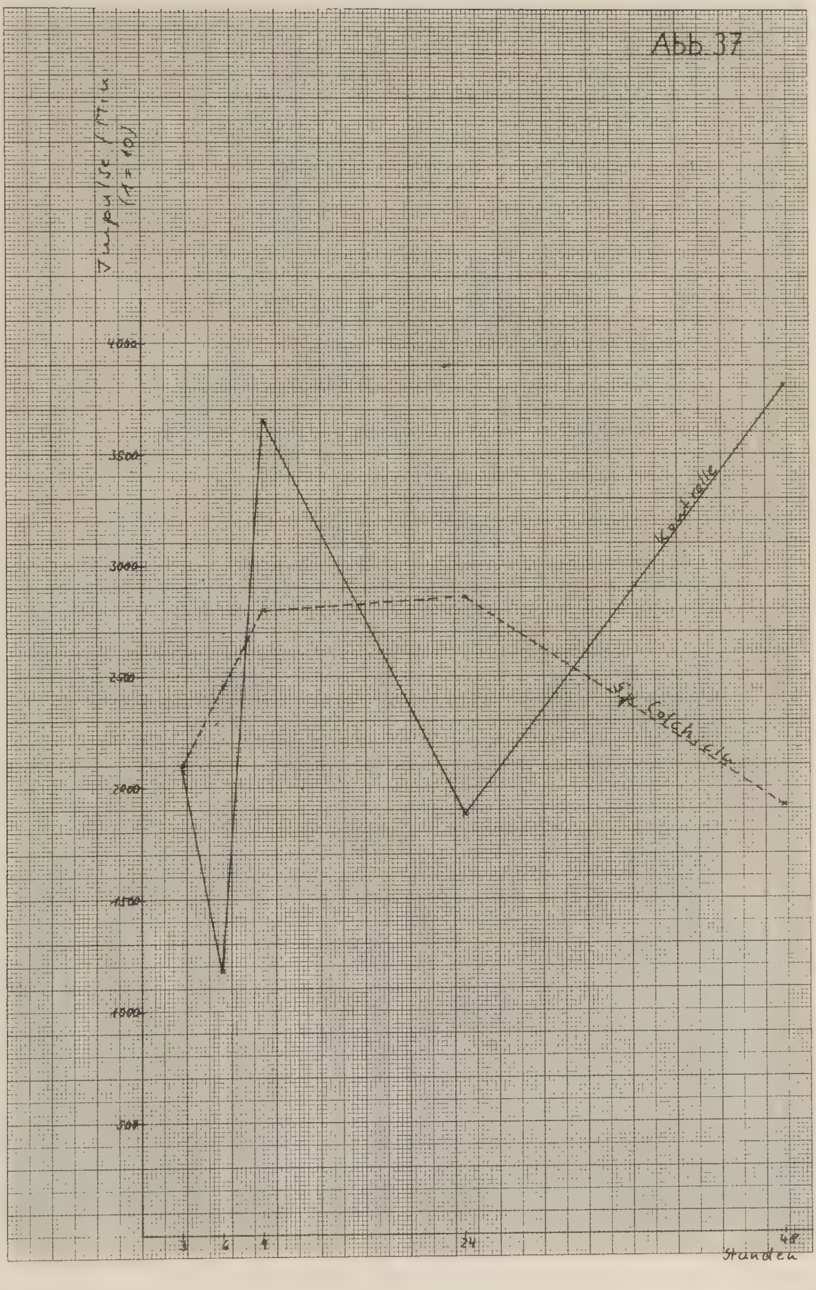


Abb. 36
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Kontrolle
0,05 % Butazolidin
0,1 % Butazolidin
3
6
9
24
48
Stunden


Impulse / Min
(1 = 10)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
3
6
9
24
48
Stunden
Kontrolle
Colchicin
Abb. 37

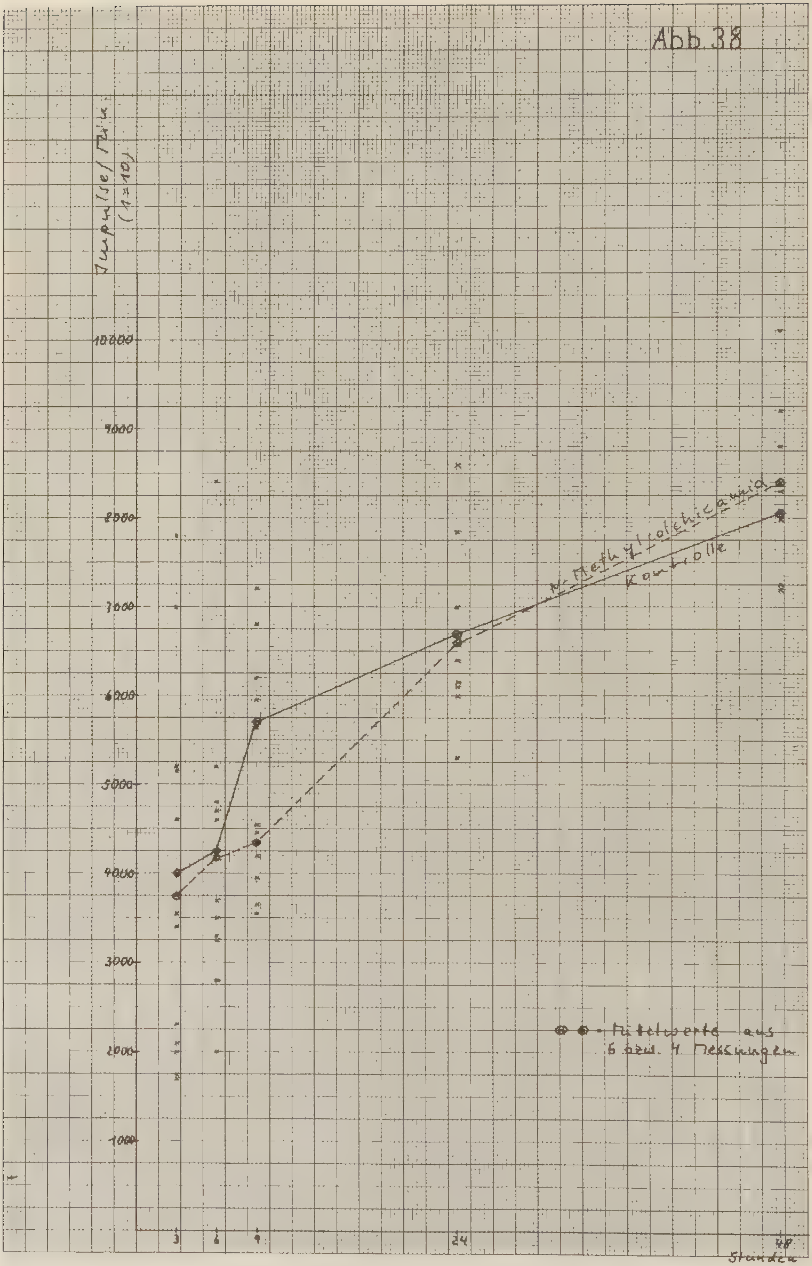


Abb. 38
Impulse/Min. (1 = 10)
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
3
6
9
24
48
Stunden
N-Methylcolchicamid
Kontrolle
Mittelwerte aus 6 bzw. 4 Messungen

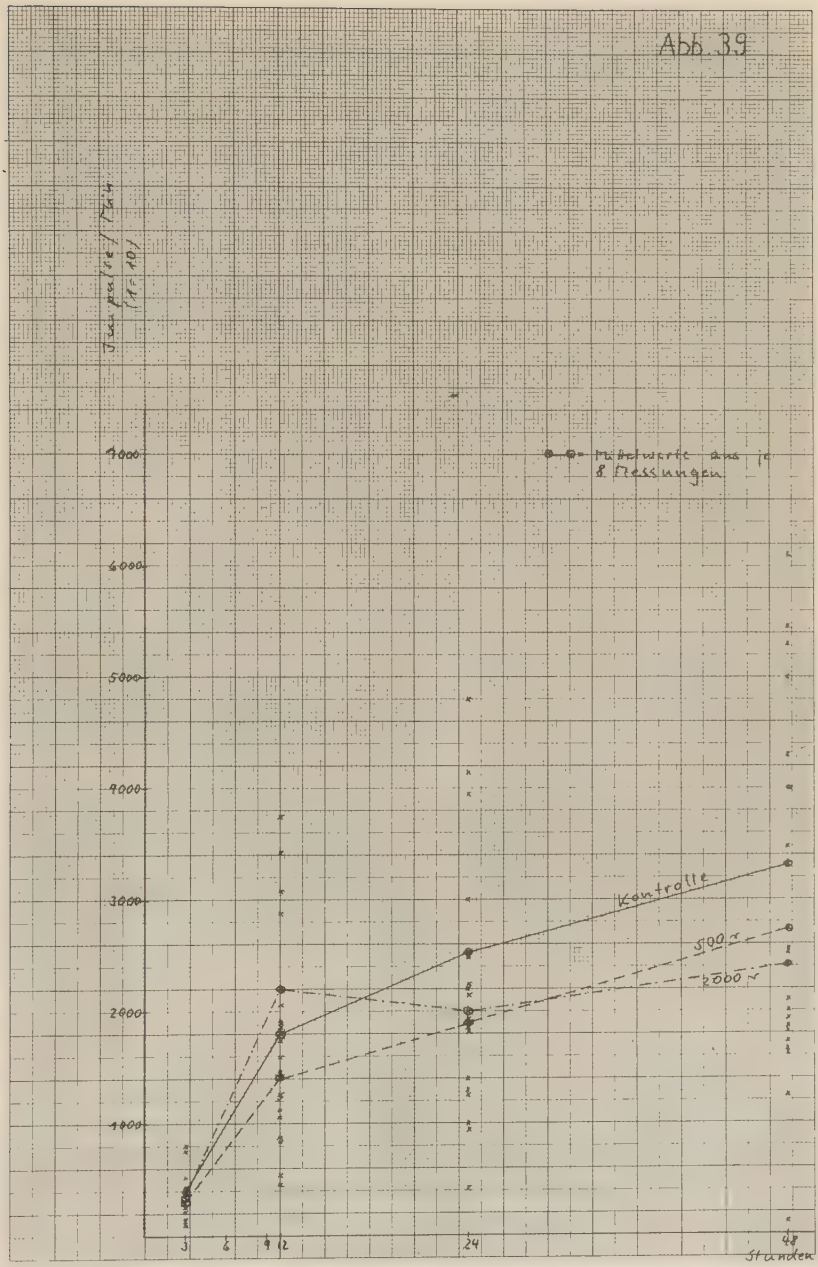


Abb. 39
Mittelwerte aus je 8 Messungen
Kontrolle
500 r
2000 r
Stunden

4. ZUR AUFNAHME VON GUANIN DURCH L-ZELLEN:

Über einen fraglichen Einbau von markiertem Guanin, das in der Nahrung zugeführt wird, in die Nucleinsäuren besteht eine Fülle von Literatur mit sehr widersprechenden Ergebnissen. So finden Plentl und Schoenheimer (33) bei Verfütterung von ^{15}N-markierten Guanin an Ratten keine Aufnahme des Isotops in die Nucleoproteine, Brown et al. (34) geben eine geringe, aber definierte Inkorporation der markierten Purinbase in die Nucleinsäuren von normalem und Tumorgewebe carcinomtragender Mäuse an.

Bei Zusatz von ^{14}C-Guanin zum Suspensionsmedium fanden wir an L-Zellen 48 Stunden nach Versuchsbeginn eine Aufnahme von 6 % des Adeninkontrollwertes (Abb. 40).

5. ZUR FRAGE DER EIGNUNG VERSCHIEDENER METHODEN:

Zur Abklärung der Verwendbarkeit der 5 zur Verfügung stehenden Methoden dienen die folgenden Experimente:

a) sog. schneller Roller-Apparat:

Bei der Zählung der L-Zellen nach Inkubation im schnell rotierenden (4600 Uph) Rollerapparat ergibt sich folgendes:

Dauer der Bebrütung		1 Stunde	24 Stunden	48 Stunden
Zellzahl	A	67	14	11
	B	75	17	16

Es zeigt sich also innerhalb der ersten 24 Stunden eine Abnahme der Zellzahl auf ca. 1/4 des Ausgangswertes, während in späteren Versuchszeiträumen die Zahl praktisch gleich bleibt. In keinem Fall können im Präparat nach Rollerpassage Mitosen beobachtet werden, wir haben es dennoch immer mit überlebendem bzw. absterbendem, und nicht mit wirklich wachsendem Gewebe zu tun.

b) Polyamidgitter im schnellen Roller-Apparat:

Bei der Bestimmung der Adeninaufnahme durch Fibroblasten, welche im schnellen Roller-Apparat auf Perlonnetzen gezüchtet wurden (Abb. 41), zeigt sich ein von 4 bis 53 Stunden ständig steigender Einbau der markierten Base. Im fixierten und gefärbten Präparat füllen die Zellen die Maschenräume des Gitters meist vollständig aus; während sie in Suspension nach Passage im schnellen Roller-Apparat abgekugelt und geschädigt erscheinen, bieten sie hier das charakteristische Bild der Fibroblasten:

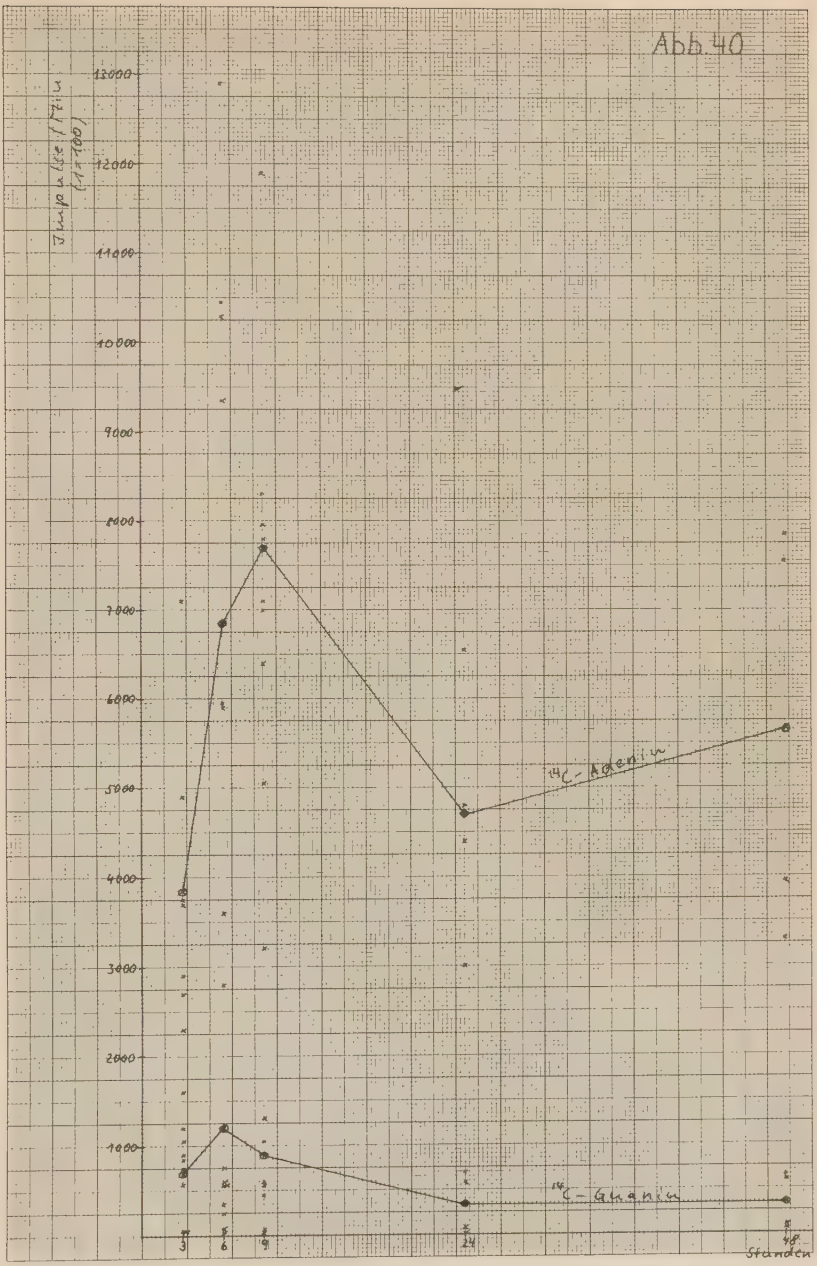


Abb. 40
Impulse / Min (1 = 100)
13000
12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
3
6
9
24
48
Stunden
14C - Adenin
14C - Guanin

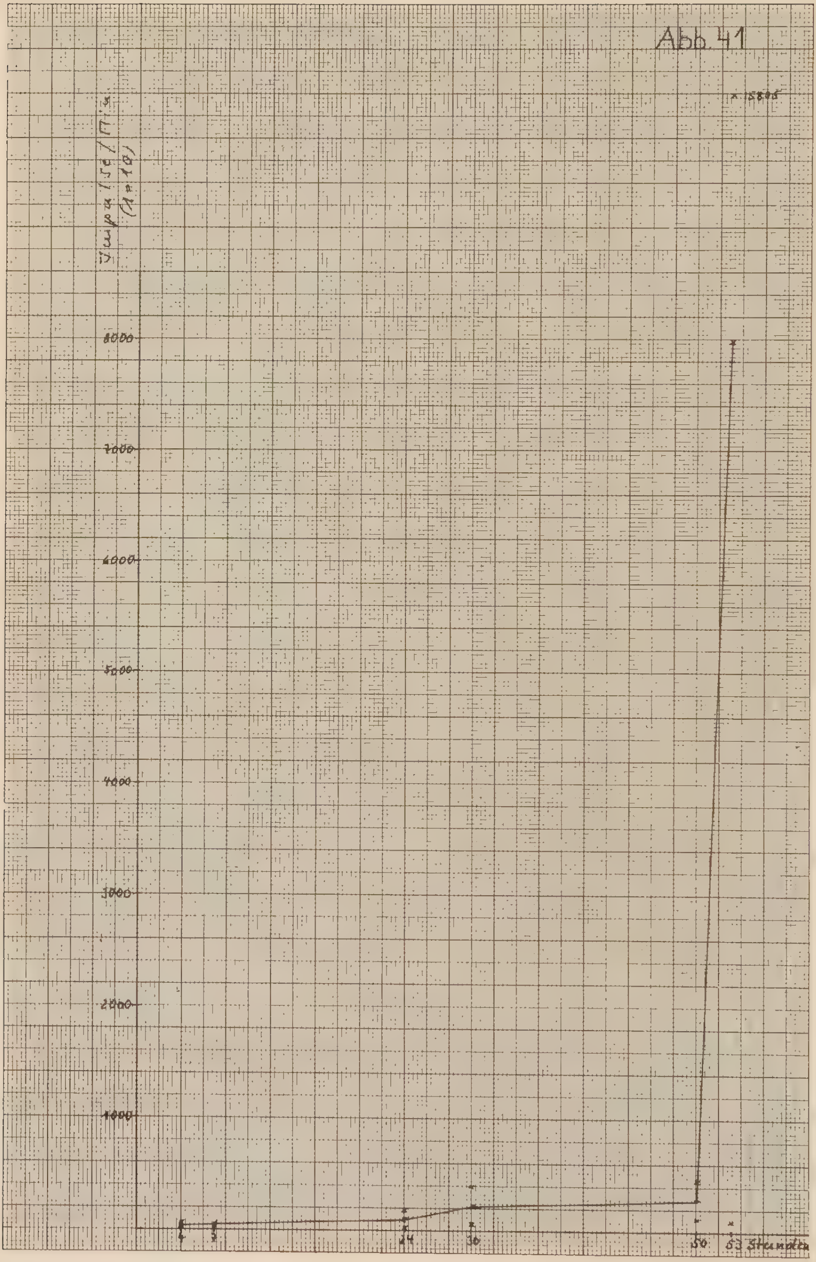


Abb. 41
x 15805
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
24
30
50
53 Stunden

spindelförmige Zellen mit langen, schmalen Plasmafortsätzen (Abb. 42). Mitosen sind sichtbar, die L-Zellen stellen auf Polyamidgittern ein wachsendes Gewebe dar.

c) Sog. langsamer Roller-Apparat:

Die Beurteilung der Adeninaufnahme an L-Zellen in langsam rotierenden Röhrchen (8,5 Uph) zeigt, dass frisch umgesetzte Zellen eine bessere Aufnahmefähigkeit für das Isotop besitzen als solche, die bereits 48 Stunden im Roller-Apparat angewachsen sind (Abb. 43). Frisch umgesetzte Fibroblasten weisen einen ständig steigenden Einbau der markierten Base auf, der bei 48 Stunden sein Maximum noch nicht erreicht hat. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Aufnahmesteigerung gegenüber dem 3-Stunden-Wert 92 %. Die Fehlerbreite der Methode ist jedoch gross: 48 Stunden nach Zugabe von je 0,2 /uC/ml ^{14}C-Adenin zu 3 Röhrchen Zellsuspension ergeben sich folgende Aufnahmewerte, ausgedrückt in % der höchsten Impulszahl (Abb. 44):

Röhrchen A: 100 %
Röhrchen B: 41 %
Röhrchen C: 20 %

Abb. 42: Querschnitte von Fasern des Perlongitters "Monodur", Maschenweite 140 /u, umwachsen von dichten Lagen von L-Zellen, die auch die Zwischenräume vollständig ausfüllen. Vergr. 470x

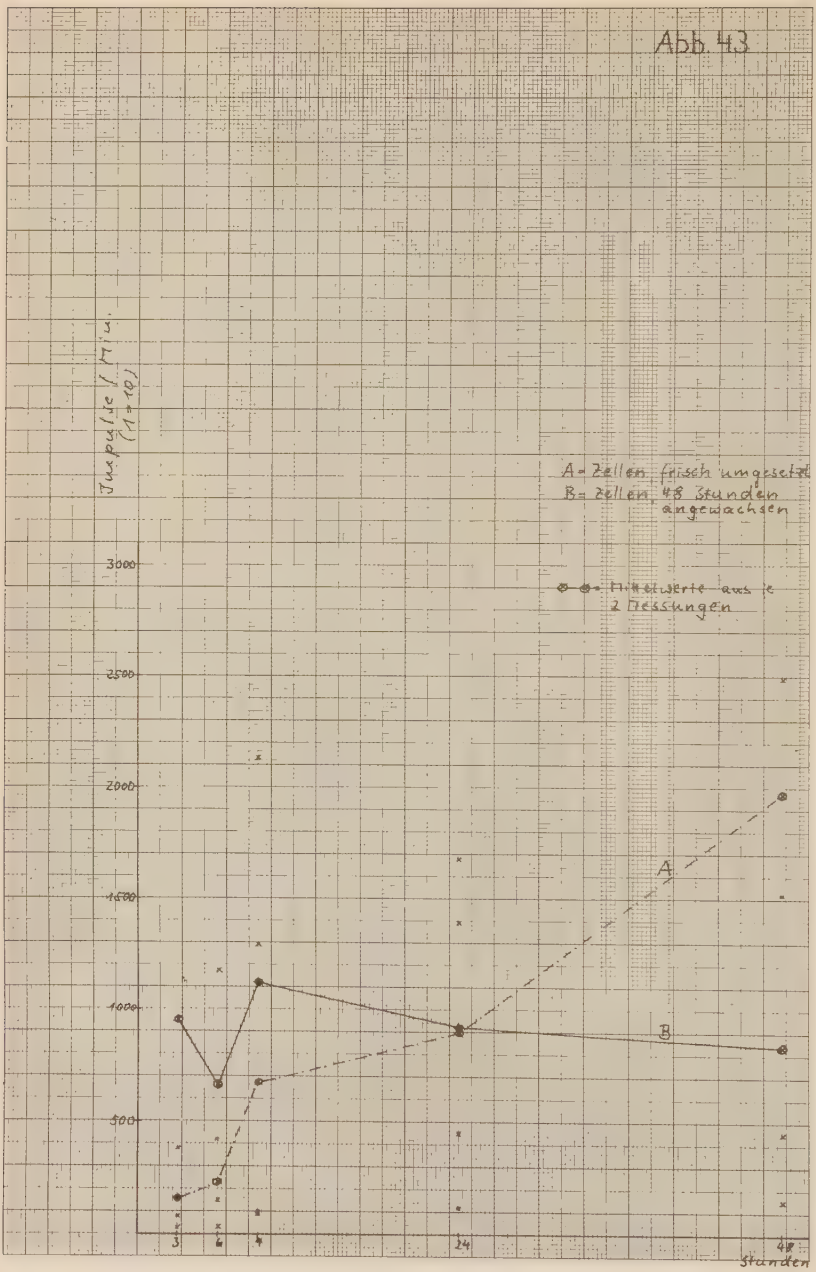


Abb. 43
Impulse / Min.
(1 = 10)
A = Zellen frisch umgesetzt
B = Zellen 48 Stunden angewachsen
Mittelwerte aus je 2 Messungen
3000
2500
2000
1500
1000
500
A
B
3
4
24
48
Stunden

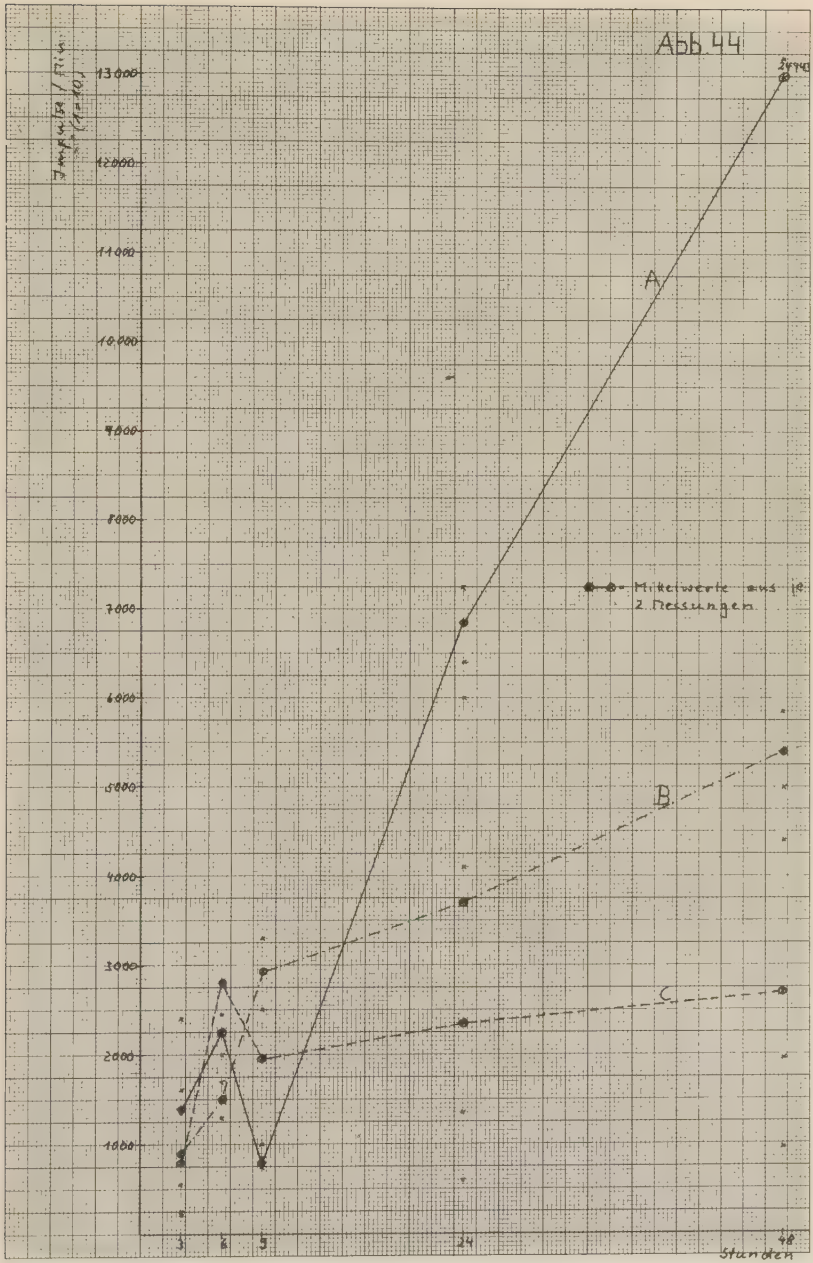


Abb. 44
Impulse / Min (1 = 10)
13000
12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
A
B
C
Mittelwerte aus je 2 Messungen
3
6
9
24
48
Stunden

d) Stehende Vierkantflaschen-Kultur:

Die nach Angebot des markierten Adenins an Zellen in Flaschenkulturen erhaltenen Werte müssen statistisch beurteilt werden. Zur Klärung der Streubreite wird die nach dem Trypsinieren der Zellen immer stattfindende Verklumpung durch Homogenisieren gelöst und die Adeninaufnahmewerte, ohne und mit Beziehung auf das Gewicht der Proben graphisch dargestellt (Abb. 45). Die stärkste Streuung von ± 18 % zeigt sich erwartungsgemäss bei den verklumpten, nicht homogenisierten Zellsuspensionen, die geringste bei den homogenisierten, nicht auf das Gewicht bezogenen Proben.

e) CARRELflaschen-Kultur:

Das Maximum der Adeninaufnahme für Zellen in Carrelflaschen zeigt sich nach 3 Stunden, 20 Stunden später beträgt die Impulszahl 95 % dieses Wertes (Abb. 46).

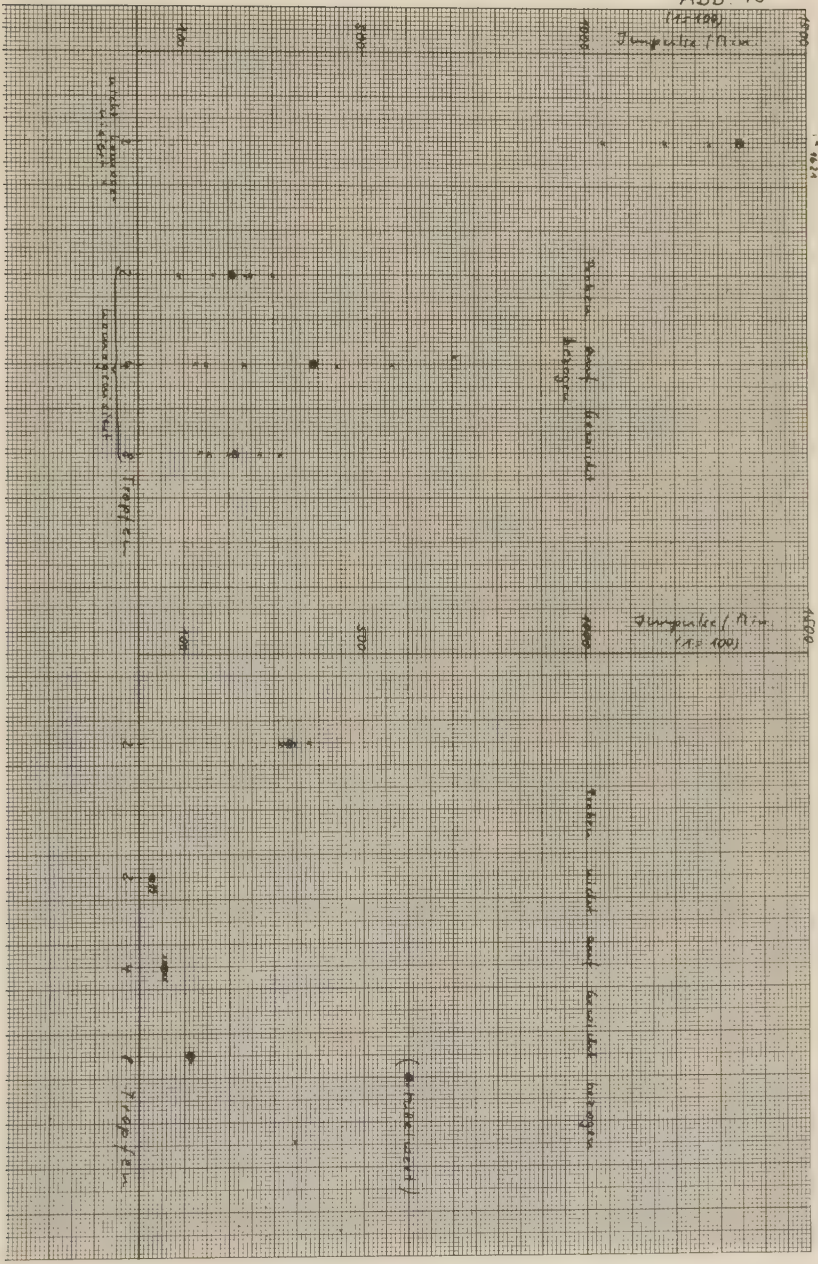
Die Fibroblasten zeigen bei mikroskopischer Betrachtung in situ etwa gleiches Wachstum wie in den Vierkantflaschen, jedoch tritt eine Verarmung des Mediums an Nährsubstanzen weit schneller ein als bei diesen.

f) Kurvenmässige Darstellung der Aufnahme an ^{14}C-Adenin für die verwendeten Methoden:

Die Abbildungen 17 (schneller Roller-Apparat), 18 (stehende Vierkantflasche), 41 (Polyamidgitter im schnellen Roller-Apparat), 44 (langsamer Roller-Apparat) und 46 (Carrelflasche) zeigen für alle verwendeten Methoden einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Aktivität. Die Steigerung der Impulszahl des Endwertes gegenüber dem Ausgangswert beträgt für

a) den schnellen Roller-Apparat	nach 48 Stunden	99 %
b) Polyamidgitter	nach 53 Stunden	99 %
c) den langsamen Roller-Apparat	nach 48 Stunden	92 %
d) die Vierkantflasche	nach 24 Stunden	45 %
e) die Carrelflasche	nach 23 Stunden	39 %

Abb. 45



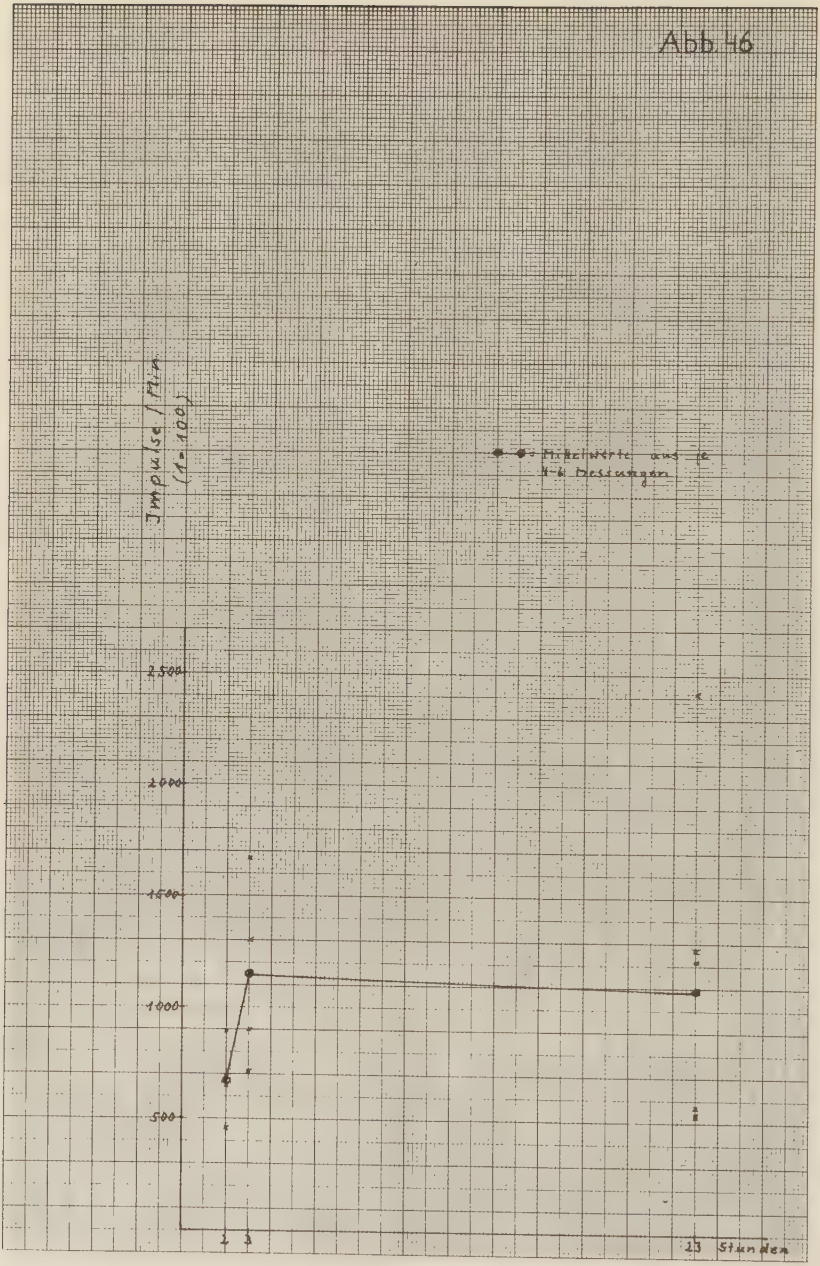


Abb. 46
Impulse / Min
(1 : 100)
Mittelwerte aus je 4-6 Messungen
2500
2000
1500
1000
500
2
3
23
Stunden

D. DISKUSSION

Die Grösse von Einbau und Umsatz radioaktiv markierter Substanzen kann als Massstab für die Vitalität des verwendeten Gewebes dienen. Geeignet sind solche Isotope, welche keine Störung im Zellstoffwechsel hervorrufen, sich also biologisch wie das inaktive Element verhalten. Schon geringe, chemisch kaum nachweisbare Mengen physiologischer, markierter Stoffe sind hier methodisch leicht zu erfassen und geben Aufschluss über die Aktivität bestimmter Stoffwechselvorgänge.

Das in unseren Versuchen an Mäusefibroblasten (L-Zellen) und Zellen des Mäuseascitestumors (MAT) verwendete markierte Adenin wird als Purinbase in die Nucleinsäuren, hauptsächlich in die DNS, eingebaut; der Grad dieses Einbaus ist der Proliferationsrate der verwendeten Zellen proportional, da sich nicht teilende Zellen keine DNS synthetisieren (35). - Die Spezifität dieser Stoffwechselleistung und die Abhängigkeit der Isotopenaufnahme von der Integrität der Zelle ist zu beweisen durch:

a) Altersabhängigkeit:

L-Zellen verschiedenen "Alters" (d.h. mit verschiedenem Abstand von der Erneuerung der Nährlösung) weisen gemäss ihrem unterschiedlichen Ernährungs- und Stoffwechselzustand unterschiedliche Verwertung von Adenin auf (Abb. 23). Es ergibt sich ein Abfall der intrazellulären Aktivität proportional dem "Alter" der Fibroblasten, der durch Angebot neuer Nährflüssigkeit aufgehalten bzw. in einen Aktivitätsanstieg umgekehrt werden kann.

b) Anstieg in der Zeit:

Mit zunehmendem Abstand vom Zeitpunkt der Adeninzugabe zu dem Suspensionsmedium steigt die Aktivität der Zellen (Abb. 17), gemäss einer ständigen Stoffaufnahme durch lebendes Gewebe. Überwiegen schliesslich infolge Nährstoffverarmung Substanzabbau und -abgabe, zeigt sich als Ausdruck der sinkenden Vitalität ein Abfall in der zellulär gebundenen Aktivität.

c) Konzentrationsabhängigkeit:

Bei gleichzeitigem Angebot inaktiven und markierten Adenins ergibt sich eine Senkung der Aufnahme für das Isotop, beide Stoffe verhalten sich biologisch gleich, sie werden gleichermassen durch die Zelle aufgenommen (Abb. 22).

Bei verschiedenen untersuchten Konzentrationen der markierten Base er-

gibt sich eine Aufnahme, die proportional der verwendeten Menge erfolgt. Markiertes und inaktives Adenin addieren sich hierbei. Die minimale Aktivität, die eben noch von L-Zellen aufgenommen wird, liegt bei 0,03 /uC/ml. Als günstigste Konzentration im Suspensionsmittel für unsere Versuche erweisen sich 0,1 - 0,3 /uC/ml (Abb. 19, 20, 21).

d) Hemmbarkeit:

Verschiedene Schritte des Zellstoffwechsels können durch chemische Substanzen gehemmt werden, was ein Absinken der Isotopenaufnahme zur Folge hat. Monojodessigsäure bewirkt 3 - 48 Stunden nach Zugabe zum Suspensionsmittel ein deutliches Absinken des Aufnahmewertes für Adenin (Abb. 31, 32, 33, 34).

e) Aufnahme durch tote Zellen:

Deutlich wird die Abhängigkeit der Stoffaufnahme von der biologischen Intaktheit des Gewebes bei Adeninangebot an hitzedenaturierte Zellen: es findet keine Aufnahme des Isotops statt (Abb. 24). Mit Zerstörung der Fermentkoordination und der Regulationsmechanismen der Zelle durch die Hitze können keine Stoffaufnahme- oder -umsatzleistungen mehr vollbracht werden.

Für einen Einbau von Adenin in lebende Substanz liegen Untersuchungen von Brown, Roll und Plentl (36) vor: bei Verfütterung der ^{15}N-markierten Purinbase an Ratten fanden die Autoren, dass 13,7 % des Gesamtadenins und 8,2 % des Guanins der Nucleinsäuren von dem markierten Adenin gestellt werden, während die Pyrimidine kein Isotop enthalten. Lajtha, Oliver und Ellis (35) geben an, dass die DNS-Synthese nur während einer begrenzten Zeitspanne im Zellzyklus stattfindet und zwar während 12 - 15 Stunden. Unmittelbar vor der Mitose liegt ein kurzes, synthesefreies Intervall, während auf die Teilung ein längerer Zeitraum folgt, in welchem kein DNS-Aufbau stattfindet.

Die Aufnahme von Adenin ist also an DNS-Synthese und damit an Wachstum gebunden. Methoden, bei welchen Versuche zur Stoffaufnahme an überlebendem bzw. absterbendem Gewebe vorgenommen werden, sind daher ungeeignet.

Der sog. schnelle Roller-Apparat (4600 Uph) bewirkt durch seine hohe Drehzahl einen Abfall der Zellpopulation nach 24-stündiger Inkubation auf 1/4 des Ausgangswertes, offenbar infolge mechanischer Schädigung der Fibroblasten. Dieser Wert bleibt bei weiterer Züchtung praktisch gleich, was auf Auslese der widerstandsfähigsten Zellen innerhalb des ersten Tages schliessen

lässt. Bei Züchtung in der stehenden Flasche, nach längerem Aufenthalt der Zellen im schnellen Roller-Apparat, wachsen die Fibroblasten wieder, während des Rotierens finden sich jedoch im Präparat in keinem Fall Mitosen. - Obwohl also im schnellen Roller-Apparat kein Wachstum stattfindet, ist eine deutliche Hemmung der Adeninaufnahme durch Monojodessigsäure nachzuweisen.

Die Züchtung der Zellen auf Polyamidgittern von ca. 6 mm^2 Fläche im schnellen Roller-Apparat wurde vorgenommen wegen der deutlichen Tendenz der im Suspensionsmittel abgekugelten Fibroblasten, sich an der Glaswand am Ende der waagrecht rotierenden Flüssigkeitsschicht oder an mikroskopischen Verunreinigungen des Mediums festzusetzen und in Spindelform zu wachsen. Mit grosser Wahrscheinlichkeit ist die spindelige Zellform und das Haften auf der Unterlage für die Fibroblasten des Stammes L die physiologische Form. Auch daher erklärt sich die ungünstige Wirkung des schnellen Rotierens im Roller-Apparat. -

Bis zu einer kritischen Maschenweite füllen die Zellen innerhalb von 24 - 48 Stunden die Zwischenräume der Netze vollständig aus, sie wachsen ebenfalls entlang der Fäden in dichten Lagen auf der Ober- und Unterseite der Gitter (Abb. 10, 11, 42). Bei mikroskopischer Betrachtung fixierter und gefärbter Präparate zeigen sich reichlich Mitosen: der Vorteil des Experiments an wachsendem Gewebe fällt bei dieser Methode mit der durch die Rotation der Röhrchen gewährleisteten genügenden Nährstoffversorgung zusammen. Bei Weiterzüchtung der Fibroblasten in der stehenden Flasche nach Loslösung von den Gittern mittels Trypsinlösung fallen zwar morphologische Unterschiede gegenüber der Stammkultur auf, die Zellen zeigen jedoch gutes Wachstum.

Die im Adeninaufnahmeversuch an Zellen auf Polyamidgittern erhaltene Kurve (Abb. 41) lässt die Methode brauchbar erscheinen, ungünstige Faktoren stellen jedoch ein unterschiedliches Bewachsen der einzelnen Gitter durch die Zellen dar, sowie eine Tendenz der Gitter, aneinander und an der Glaswand festzuhaften, die auch bei Verwendung silikonisierter Röhrchen nicht beseitigt werden kann. Ein quantitativer Vergleich der Ergebnisse ist daher kaum möglich.

Bei der Rotationsgeschwindigkeit des sog. langsamen Roller-Apparates (8,5 Uph) sind die Zellen nicht mehr im Medium suspendiert, sondern wachsen in der üblichen Spindelform an der Glaswand fest. Gute Nährstoffversorgung ist auch hier gewährleistet, die nach der bei Auswertung nötigen Trypsinierung immer stattfindende Verklumpung der Zellen stellt jedoch die Gültigkeit der Ergebnisse in Frage. Die grosse Schwankungsbreite der Methode lässt dies deutlich werden und zeigt gleichzeitig die Fehlerbreite für die quantitative Bestimmung des Stoffumsatzes (Abb. 44).

Aufnahmekurven für das Isotop an Zellen in stehenden Vierkant- und Carrelflaschen liefern nur statistisch verwertbare Ergebnisse, da während des Versuches keine Proben entnommen, sondern nur die Gesamtflaschen ausgewertet werden können. Die einzelnen Proben variieren in ihrem Gehalt an markierten Zellen, es wird daher eine Beziehung der gemessenen Impulszahl auf das Substanzgewicht nötig. Diese Gewichtsbeziehung stellt eine erhebliche Fehlerquelle dar, da die verwendete elektrische Waage mit einer Genauigkeit von 1/100 Milligramm für die minimalen Gewichte von Zellproben zu ungenau ist.

Keine der 5 verwendeten Methoden erweist sich also als sehr günstig im Sinne der Aufrechterhaltung einer genügenden Zellproliferation, ausreichender Nährstoffversorgung und minimaler Fehler bei der Auswertung.

Als günstig wäre ein System zu betrachten, bei welchem suspendierte Zellen in Röhrchen rotieren mit einer Drehzahl, welche die Zellen nicht schädigt, sondern eine ausreichende Proliferation gewährleistet. Diese Forderung wird durch die von Earle et al. (37) angegebene Methode am ehesten erfüllt: Earle gibt als Voraussetzung für Züchtung von Zellen in Suspensionskulturen (im Sinne einer echten Suspension) folgende Faktoren an:

a) Leichte Erhöhung der Viskosität des Mediums z.B. durch Zugabe von Hyaluronsäure oder Methylcellulose.

b) Adaequate Zirkulation der Kulturflüssigkeit. Geschwindigkeit und Art der Zirkulation dürfen die Zellen nicht mechanisch schädigen.

c) Adaequate Zellpopulation zu Beginn der Kultur.

Earle fand in 5-tägigen Experimenten an L-Zellen mit Rotationsgeschwindigkeiten von 300 bzw. 2400 Uph nach einem anfänglichen, 24-stündigen Abfall in der Zellpopulation von 24 - 120 Stunden eine schnelle Proliferation der Fibroblasten. Mikroskopische Untersuchung ergab, dass keine Zellen an der Oberfläche des Glases hafteten.

Um die Gültigkeit der an intaktem, wachsendem Gewebe erhaltenen Ergebnisse der Adeninaufnahme sicherzustellen, ist der Nachweis der Hemmbarkeit dieser Aufnahme durch Eingreifen in den Zellchemismus unerlässlich. Dies geschieht z.B. durch Colchicin, das die Zellen bei der Mitose in der Metaphase arretiert und dadurch die Nucleinsäuresynthese hemmt.

Wir konnten nach 48 Stunden bei einer Dosis von 1 γ/ml einen um 50 % gesenkten Aufnahmewert für Adenin gegenüber der Kontrolle erzielen (Abb. 37). Es erweist sich hierbei die Methode des schnellen Roller-Apparates als günstigste, bei Wiederholung des Versuches in der stehenden Flasche mit N-Methylcolchicamid lässt sich keine signifikante Aufnahmekurve für das Isotop erhalten (Abb. 38).

Die genaue Wirkung des Colchicins auf den Zellstoffwechsel ist noch nicht bekannt. H. Lettré ('30) nimmt mehrere Angriffspunkte (zumindest 2) der Substanz in der Zelle an: bei grosser Dosis wird zunächst der Beginn der Zellteilung gehemmt, bei kleinerer nur die Spindelbildung in der Metaphase. Nach Lettré besitzt N-Methylcolchicamid (NMC) einen mehr als 10-fach stärkeren Effekt als Colchicin. Die Wirkungsmechanismen beider Substanzen entsprechen sich qualitativ, jedoch zeigt sich bei dem basischen NMC gegenüber dem neutralen Colchicin eine Wirkung als Kationenverdränger, wodurch eine stärkere Quellung der Zellen und damit eine stärkere Zerstreuung der Chromosomen zustandekommt. Ausserdem findet sich nach Anwendung von NMC auf Zellkulturen eine vermehrte Riesenzellbildung: es handelt sich dabei um Rekonstruktion von Teilkernen aus einzelnen oder mehreren Chromosomen (Abb. 47).

Monojodessigsäure (MES) greift hemmend in den Kohlenhydratstoffwechsel ein: es blockiert die Glycolyse auf der Stufe der Triosephosphatdehydrierung. Nach Holzer (38) tritt diese Hemmung beim Mäuseascitestumor in einer Konzentration von 10^{-4} molar zu 100 % auf. Wrba (1) findet bei Anwendung der gleichen Konzentration Monojodacetat auf Kulturen erwachsener Organe eine Hemmung der Phosphataufnahme von rund 60 %, bei embryonalen Explantaten von 75 - 80 % gegenüber den Kontrollkulturen.

Abb. 47: L-Zellen nach Einwirkung von Colchicin (Vergr. 1000x): Ausbildung mehrkerniger und während der Mitose arretierter Zellen.

Unsere Ergebnisse stimmen annähernd hiermit überein:

Bei Zugabe von 0,03 bzw. 0,15 ccm 0,01 molarer MES zu L-Zellsuspensionen mit schnellen Roller-Apparat erzielten wir eine Hemmung der Adeninaufnahme von 11 bzw. 88 % gegenüber dem Kontrollwert (Abb. 32), in der stehenden Flasche bei Verwendung von 0,03 bzw. 0,2 ccm MES nach 50 Stunden eine Hemmung von 100 %.

Bei dem Versuch der Züchtung von L-Zellen in stehenden Flaschen nach Einwirkung von Monojodessigsäure im schnellen Roller-Apparat zeigt sich, dass die Zellen durch Dosen von 0,03 - 0,15 ccm MES irreversibel geschädigt sind, es findet kein Wachstum mehr statt.

Bei Untersuchungen am Ehrlichschen Mäuseascitestumor fanden wir nach 24 Stunden durch 0,03 bzw. 0,1 ccm MES eine Hemmung der Isotopenaufnahme von 64 bzw. 87 % gegenüber dem Kontrollwert (Abb. 34). - Die Zellen dieses Tumors befinden sich in den ersten Tagen nach der Überimpfung in einer sehr günstigen Stoffwechsellage, mit zunehmendem zeitlichen Abstand von der Überimpfung nimmt die Zahl der Zellen in Mitose ab (1). Insgesamt hat jedoch diese Geschwulst eine weit höhere Stollwechselrate als die L-Zellen, bei denen sich jeweils nur ca. 0,05 % der gesamten Zellzahl in Mitose befinden (32). Im Gegensatz zu den Fibroblasten ist es aber bisher noch nicht gelungen, Ascitestumorzellen im Sinne einer Vermehrung der Zellen in Suspension zu züchten.

Mechanismen, welche eine kontinuierliche Vitalitätsverminderung in Abhängigkeit von ihrer Dosierung herbeiführen - wie toxische Substanzen oder Röntgenstrahlen- sind besonders geeignet, die Reaktion des Stoffwechsels auf Schädigungen deutlich zu machen:

Butazolidin aktiviert nach Exer (39) in Dosen von 10 mg% die Oxydation im Krebszyklus von Mitochondrien der Rattenleber. Delffel und Griffin (40) verfolgten den Einbau von radioaktivem Phosphat in die Nucleinsäuren der Rattenleber unter dem Einfluss von Butazolidin in einer Dosis von 10 mg%. Es fand sich eine signifikante Erhöhung der Radioaktivität der Säuren, insbesondere der RNS, wobei jedoch die Gesamtmenge der Nucleinsäuren praktisch unverändert blieb. Die Autoren schlossen daraus, dass vor allem der Abbau der Nucleinsäuren zu Harnsäure und anderen Verbindungen gehemmt wird. Wrba (1) findet mit der gleichen Dosis an Zellsuspensionen des Ehrlichschen Mäuseascitescarcinoms auf Grund einer Atmungssteigerung eine Intensivierung des oxydativen Abbaus der Glucose, während die hohe Konzentration von 1 g% im Suspensionsmittel in der gleichen Zellpopulation einen erheblichen Hemmeffekt hat.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigt sich bei Zusatz von 0,1 g%

Butazolidin zu Suspensionen von Mäusefibroblasten eine Adeninaufnahme von 10 %, bei Zusatz von 10 mg% eine Aufnahme von 120 % des Kontrollwertes (Abb. 35, 36).

Gegen Röntgenstrahlen ist der Nucleinsäurestoffwechsel sehr empfindlich. Die ersten Untersuchungen auf diesem Gebiet stammen von v. Euler und v. Hevesy (41, 42): mit Hilfe von ^{32}P stellen die Autoren eine Hemmung der Synthese von DNS durch Röntgenstrahlen fest. Nach Howard und Pelc (43) ist die sensible Phase für die strahleninduzierte Hemmung der DNS-Synthese bei sich teilenden Zellen die Zeit unmittelbar vor der Mitose. Während dieser über die ionisierenden Strahlen keinen Einfluss aus. Reid und Gifford (32) finden bei L-Zellen in den ersten 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2000 r einen Wachstumsstillstand, gefolgt von einem langsamen, beständigen Abfall der Zellpopulation bis zu dem Punkt, an welchem nach 13 Tagen die Zellmenge ungefähr die Hälfte von der ursprünglichen beträgt. Die Autoren können in keiner Kultur Erholung feststellen und geben daher diese Dosis als sicher letal an. Bei Bestrahlung mit 500 r finden sie völlige Erholung, der Zeitpunkt, bei welchem "normale" Proliferation beginnt, liegt bei 7 - 16 Tagen. Lajtha, Oliver und Ellis (35) bestrahlten menschliche Knochenmarkssuspensionen mit Dosen von 5000 r, welche eine starke Hemmung der DNS-Synthese und einen sofortigen, kompletten Stop der Mitosen bewirkten. Die Autoren finden bei dieser hohen Strahlendosis dagegen nur einen mässigen Abfall des RNS-Umsatzes. Whitfield und Rixon (44) diskutieren die beiden Möglichkeiten der Strahlenwirkung auf die DNS:

a) Röntgenstrahlen interferieren direkt mit einem bestimmten Schritt in der Synthese der polymerisierten DNS.

b) Die DNS-Synthese ist relativ unempfindlich Strahlung gegenüber, ihr Stillstand ist eine sekundäre Konsequens des Stops mitotischer Zellteilungen.

Die Autoren finden auf Grund von Untersuchungen an L-Zellen, dass die DNS-Synthese hier nicht parallel der Wchstumskurve geht. Als strahlenempfindlichste Zellfunktion erweist sich ihnen die Zellvermehrung, DNS- und RNS-Synthese sind nur halb so empfindlich. Kulturen, die mit 4000 r bestrahlt worden waren, zeigen keine Zellvermehrung, sie wachsen trotz 4-wöchiger Inkubation nicht mehr. Der Verlust der Vermehrungsfähigkeit ist jedoch niemals begleitet von einer dauernden Unfähigkeit, DNS zu synthetisieren. Whitfield und Rixon nehmen daher an, dass die Reduktion der DNS-Synthese durch die Bestrahlung zur Reduktion der Zellvermehrung sekundär ist und nicht auf einer direkten Aktion der Röntgenstrahlen auf das DNS-synthetisierende System beruht.

An Mäusefibroblasten lassen sich nach 48 Stunden für Bestrahlungsdosen

von 500 r bzw. 2000 r Adeninaufnahmen von 83 bzw. 73 % des Kontrollwertes nachweisen (Abb. 39). Wir liegen dabei in der Wahl der Auswertungszeiten sicher zu früh, eine deutliche Auswirkung der Stoffwechselschädigung ist nach 5 - 7 Tagen zu erwarten.

Veränderungen im Zellchemismus sind auch nach Züchtung der Zellen über längere Zeiten in einem Medium zu erwarten, welches den Nährstoffansprüchen nicht genügt: Nach 2-monatiger Kultur der Fibroblasten über 12 Passagen in einem Medium aus

10 % Embryonalextrakt, 20 % Rattenserum, 70 % Hankslösung

wurde den Zellen radioaktives Adenin angeboten; es ergibt sich nach 24 Stunden eine Aufnahme von 50 % der in Kälberserum gezüchteten Kontrollkulturen.

Deutliche morphologische Unterschiede wurden dabei sichtbar, am stärksten fiel eine vermehrte Zahl von Mitosen in den Präparaten der in Rattenserum-Medium gezüchteten gegenüber den in Kälberserum-Medium kultivierten Zellen auf, sowie das Auftreten ungewöhnlich langer, dünner Fortsätze sehr protoplasmaarmer Zellen bei Verbringen der Fibroblasten in Medium auf Kälberserum-Basis nach Züchtung in Rattenserum-Medium über mehrere Passagen (Abb. 28, 29, 30).

Das Vermögen der Zelle schliesslich, nur spezifische Stoffe aufzunehmen, hat ebenfalls als eines der Kriterien für die erhaltene Vitalität des Gewebes zu gelten.

Wir verwendeten markiertes Guanin zum Angebot an die Zelle, über dessen Einbau in verschiedene Gewebe sehr widersprechende Ergebnisse vorliegen: Brown et al. (5) und Brown, Roll und Plentl (36) finden keine Aufnahme des Isotops in die Nucleoproteine, jedoch eine Umwandlung von Adenin in Guanin: die entstehende Base enthält die markierten Stickstoffatome immer noch in Stellung 1 und 3. Damit wird angenommen, dass der Purinring während der Umwandlung intakt geblieben war. Abrams und Goldinger (45) geben eine Umwandlung des zugeführten Adenins in das Nucleinsäure-Guanin, des Guanins in das Nucleinsäure-Adenin zu einem geringen Prozentsatz an. Balis und Brown (46) bestätigen diese gegenseitige Umwandlung beider Purine. Abrams (47) findet das markierte Guanin nicht nur im RNS-, sondern auch im DNS-Guanin, allerdings nur zu 6 % des RNS-Wertes. Graff et al. (48) finden jedoch bei parenteraler Verabfolgung der Purinbase an Tiere, welche spontane oder transplantable Mamma-Carcinome trugen, keinen Guanineinbau in die Nucleinsäuren, während Mandel und Carló (49) bei intraperitonealer Injektion des Isotops an sarkomtragende Mäuse die Aktivität hauptsächlich in der Organ-RNS-Guanin-Fraktion wiederfinden, zu einem kleinen Teil auch im Organ-RNS-Adenin. Dagegen kann in Tumornucleinsäuren

nur ein sehr kleiner oder unbedeutender Betrag gefunden werden.

Alle diese Untersuchungen wurden mit ^{15}N-markiertem Guanin an den Atomen 1 und 3 im Purinring und in der 2-Aminogruppe durchgeführt. Nach Balis, Marrian und Brown (50) geht jedoch, obwohl in vivo nur ein geringer Abbau des Purinringes stattfindet, die 2-Aminogruppe des Guanins im Katabolismus zu Allantoin verloren und steuert eine beträchtliche Menge markierten Ammoniaks dem Körperreservoir bei. Dieser wiederum führt zu einer geringen Inkorporation von ^{15}N in die meisten der stickstoffhaltigen Bestandteile, was jede sehr geringe spezifische Inkorporation verdunkelt.

Die Autoren verwenden daher 8-^{14}C-Guanin, bei dessen Verfütterung an die Sherman-Stamm-Ratte zeigt sich eine sehr geringe spezifische Inkorporation von Guanin in das Polynucleotid-Guanin.

Zur Aufnahme der Base in Suspensionskulturen sind uns keine Versuche bekannt, der Grund hierfür dürfte in der beschriebenen Schwerlöslichkeit der Substanz liegen.

An Kulturen von L-Zellen erhielten wir nach 48 Stunden eine Guaninaufnahme von 6 % des Adenin-Kontrollwertes (Abb. 40).

Der Vorteil, der in der Verwendung von Isotopen-markierten Verbindungen als Stoffwechselindikatoren begründet liegt, ist darin zu suchen, dass unwägbare Mengen zugesetzter Substanz signifikante Ergebnisse liefern. Wrba (51), Wrba, Ripoll-Gomez und Ranz (52) und Rabes und Wrba (53) konnten durch Beurteilung der Aufnahme an markiertem Phosphat Vorgänge im Zellstoffwechsel veranschaulichen, die anderen Methoden nicht zugänglich waren.

Adenin verspricht infolge seiner spezifischen Stellung im Stoffwechsel für Wachstumsfragen schlüssige Ergebnisse zu liefern. Entscheidend dafür ist die Wahl des Objektes. An Suspensionskulturen von Fibroblasten des Stammes L stösst die Umsatzbestimmung für angebotenes Adenin auf erhebliche Schwierigkeiten. Nicht wachsende Systeme (z.B. Kulturen im schnellen Roller-Apparat) sind von begrenztem Wert. Die Beziehung zwischen Vitalität der Zellen und Grösse der Aufnahme an markierter Substanz lässt sich bei allen von uns erprobten Methoden veranschaulichen. Beziehung zwischen biologischem Stadium, zwischen Nährmedium und Umweltfaktoren einerseits und Grösse der Adeninverwertung andererseits weisen in diese Richtung. Die Beeinflussbarkeit der Aufnahmegrösse durch physikalische und chemische Faktoren liefert den Beweis für die Beziehung zwischen Synthesestoffwechsel und Adeineinbau.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Aufnahme und Umsatz markierter Substanz durch die lebende Zelle kann zum Nachweis vorhandener Vitalität des verwendeten Gewebes dienen.

^{14}C-Adenin wird von Mäusefibroblasten (L-Zellen) in die zelleigenen Nucleinsäuren eingebaut, sein Einbau gibt Aufschluss über die Intaktheit der Systeme, die an Synthese und Polymerisation der Nucleotide beteiligt sind. Die markierte Base ruft keine Störung im Zellstoffwechsel hervor.

Die Abhängigkeit der Isotopenaufnahme von der Integrität der Zelle ist zu beweisen durch:

a) Altersabhängigkeit: es ergibt sich ein Abfall der Aufnahmekurve proportional dem zunehmenden "Alter" der Fibroblasten

b) Anstieg in der Zeit: mit zunehmendem Abstand vom Zeitpunkt der Adeninzugabe steigt die Impulszahl der Zellproben

c) Konzentrationsabhängigkeit: die Adeninaufnahme durch die lebende Zelle erfolgt von einer minimalen Menge ab, die eben noch aufgenommen wird, bis zu einem Grenzwert proportional der angewandten Konzentration

d) Hemmbarkeit: nach Zugabe von Monojodessigsäure zeigt sich ein stetiger Abfall der Adenineinbauwerte bis zu einer völligen Hemmung.

Colchicin ergibt einen um 50 % gesenkten Aufnahmewert gegenüber dem Kontrollwert.

Butazolidin aktiviert in Dosen von 0,001 g%, während 1 g% eine starke Senkung des Adenineinbaus zur Folge hat.

Röntgenstrahlen hemmen den Adenineinbau proportional der angewandten Dosis.

e) Fehlende Aufnahme durch tote Zellen: hitzedenaturierte Zellen zeigen keine Adeninaufnahme.

Es werden verschiedene Methoden zur Bestimmung des Umsatzes von markiertem Adenin an Suspensionskulturen angewandt und diskutiert.

Herrn Privatdozent Dr. Dr. Wrba danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für seine grosszügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ebenfalls danke ich Herrn Professor Dr. Büngeler vielmals dafür, dass ich an seinem Institut arbeiten durfte.

LITERATURVERZEICHNIS

1) WRBA H. Zeitschr. f. Zellforsch. 53, 90, 1960

2) WRBA H., H.W. KALB
Naturwiss. 46 a)405 b)78 1959

3) WRBA H., M. RIPOLL-GOMEZ, H. RANZ
Naturwiss. 47, 182/83, 1960

4) WRBA H., A. GEIPEL
Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. 134, 300, 1961

5) BROWN G.B., P.M. ROLL, A.A. PLENTL, L.F. CAVALIERI
J. Biol. Chem. 172, 469, 1948

6) EARLE W.R., J. nat. Cancer Inst. 3, 555, 1943

7) EARLE W.R., A. NETTLESHIP
J. nat. Cancer Inst. 4, 213, 1943

8) SHELTON E., W.R. EARLE
J. nat. Cancer Inst. 11, 2 817, 1951

9) SANFORD K.K., W.R. EARLE, G.D. LIKELY
J. nat. Cancer Inst. 9, 229, 1948/49

10) SANFORD K.K., W.R. EARLE, E. SHELTON, E.L. SCHILLING, E.M. DUCHESNE, G.D. LIKELY, M.M. BECKER
J. nat. Cancer Inst. 11, 1 351, 1950

11) CARREL A., A. EBELING
J. exp. Med. 34, 599, 1921

12) SÖRENSEN S.P.L.
Erg. Physiol. 12, 393, 1912

13) GASSUL R. Klin. Wschr. 5, 560, 1926

14) EDWARDS G.A., J. FOGH
Cancer Research 19, No. 6, 608, 1959

15) KAGEYAMA R. Zeitschr. f. Zellforsch. 51, 725, 1960

16) CARREL A., A.H. EBELING
J. exp. Med. 44, 261, 1926

17) FISCHER A. Zeitschr. Altersforsch. 3. 323, 1941/42

18) EVANS V.J., W.R.EARLE, K.K.SANFORD, J.E.SHANNON, H.K.WALTZ
J.nat. Cancer Inst. 11,2 907, 1951

19) MORGAN J.F., H.J.MORTON, R.C.PARKER
Proc.Soc.exper.Biol.Med. 73, 1, 1950

20) ABRAMS R., L.CLARKE
J.Am.Chem.Soc. 73, 4609, 1951

21) WEYGAND F., O.A.GROSSKINSKY
Chem.Ber. 84, 839, 1951

22) SCHITTENHELM A., E.BENDIX
Zeitschr.f.physiol.Chemie 43, 365, 1904

23) MENDEL L.B., J.F.LYMAN
J.Biol.Chem. 8, 115, 1910

24) FLURY F. Arch.f.exp.Path.u.Pharm. 73, 164, 1913

25) ULLMANN E. Arch.f.Pharm.Mitteil. 290/62, 1, 1957

26) LEUTHARDT F. Lehrb.d.physiol.Chemie Berlin 1957

27) FRITZ-NIGGLI H.
Strahlenbiologie, G.Thieme-Verlag, Stuttgart 1959

28) BENITEZ H.H., M.R.MURRAY, E.CHARGAFF
Ann.N.Y.Acad.Sci. 58, Art. 7, 971, 1954 (vgl.Nr.29)

29) LETTRE R. Ann.N.Y.Acad.Sci. 58, Art. 7, 971, 1954

30) LETTRE H., R.KRAPP, M.OCHSENSCHLÄGER
Zeitschr.Krebsforsch. 57, 142, 1951

31) PULVER R., B.EXER, B.HERMANN
Schweiz.med.Wschr. 1080, 1956

32) REID Th.R., M.P.GIFFORD
J.nat. Cancer Inst. 13,1 431, 1952

33) PLENTL A.A., R.SCHOENHEIMER
J.Biol.Chem. 153, 203, 1944

34) BROWN G.B., A.BENDICH, P.M.ROLL, K.SUGIURA
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 72, 501, 1949

35) LAJTHA L.G., R.OLIVER, F.ELLIS
Brit.J.Cancer VIII, 2, 367, 1954

36) BROWN G.B., P.M.ROLL, A.A.PLENTL
Federation Proceedings 6, 517, 1947/48

37) EARLE W.R., E.L.SCHILLING, J.C.BRYANT, V.J.EVANS
J.nat.Cancer Inst. 14,2 1159, 1954

38) HOLZER H. Medizinische 576, 1956

39) EXER B. Experientia (Basel), 12, 294, 1956

40) DELFEL N.E., A.L.GRIFFIN
Stanford Med.Bull. 11, 65, 1953

41) v.EULER H., G.v.HEVESY
Kgl.Danske Videnskab.Selskab.Biol.Medd. 17,1 1942

42) v.EULER H., G.v.HEVESY
Ark.kemi.mineral.o.geologi 17 A 1, 1943/44

43) HOWARD A., S.R.PELC
Heredity Suppl. 6, 261, 1952

44) WHITFIELD J.F., R.H.RIXON
Exp.Cell Res. 18, 126, 1959

45) ABRAMS R., J.M.GOLDINGER
Arch.Biochem. 30, 261, 1951

46) BALIS M.E., G.B.BROWN
J.Biol.Chem. 188, 217, 1951

47) ABRAMS R. Arch.Biochem. 33, 436, 1951

48) GRAFF S., M.ENGELMAN, H.B.GILLESPIE, A.M.GRAFF
Cancer Res. 11,1 388, 1951

49) MANDEL H.G., P.E.CARLO
J.Biol.Chem. 201, 335, 1953

50) BALIS M.E., D.H.MARRIAN, G.B.BROWN
J.Am.Chem.Soc. 73, 3319, 1951

51) WRBA H. Zeitschr.Krebsforsch. 63, 415, 1960

52) WRBA H., M.RIPOLL-GOMEZ, H.RANZ
Exp.Cell Res. 232, 1960

53) RABES H., H.WRBA
Klin.Wschr. 39, 206, 1961

LEBENSLAUF

Am 15. Mai 1937 wurde ich als 3. Tochter des Fabrikanten Dr. Alexander Schneider und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Meyer, in Halberstadt/Harz geboren. Die ersten Jahre verbrachte ich in Eisenberg/Thür., wo ich von 1943 - 1948 die Volksschule besuchte. Nach der Flucht meiner Eltern 1948 nach Millstatt/See, Österreich, besuchte ich 1 Jahr das Bundesrealgymnasium in Spittal/Drau. 1949 übersiedelte meine Familie nach München, ich besuchte hier 3 Jahre das Realgymnasium München-Süd, anschliessend das Realgymnasium am St.-Anna-Platz, wo ich 1956 meine Reifeprüfung ablegte.

Im Winter-Semester 1956/57 begann ich mit dem Studium der Medizin in München und bestand hier im Frühjahr 1959 die medizinische Vorprüfung. Die klinischen Studiensemester verbrachte ich in Wien und München.

Ich legte am 18. 12. 1962 das medizinische Staatsexamen in München ab.